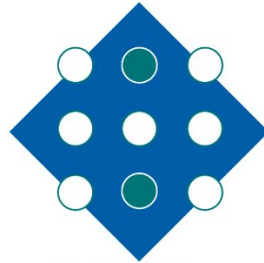




Universitat
de les Illes Balears



IdISBa



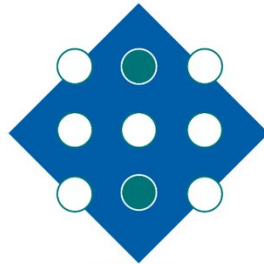
TESIS DOCTORAL
2018

**BIOMARCADORES Y APNEA OBSTRUCTIVA DEL SUEÑO.
IMPLICACIONES EN EL SÍNDROME CORONARIO AGUDO**

Josep Miquel Bauçà Rosselló



Universitat
de les Illes Balears



IdISBa



TESIS DOCTORAL

2018

**Programa de Doctorado en Investigación Translacional en
Salud Pública y Enfermedades de Alta Prevalencia**

**BIOMARCADORES Y APNEA OBSTRUCTIVA DEL SUEÑO.
IMPLICACIONES EN EL SÍNDROME CORONARIO AGUDO**

Josep Miquel Bauçà Rosselló

Director/a: Antònia Barceló Bennàsar

Tutor/a: Francisco de Borja García-Cosío Piqueras

Doctor/a por la Universitat de les Illes Balears

A mi madre

ABREVIATURAS

CPAP: presión de aire positiva continua

dsDNA: DNA libre de doble cadena

IAH: índice de apneas-hipopneas

IAM: infarto agudo de miocardio

ICP: intervención coronaria percutánea

IMC: índice de masa corporal

ISAACC: *Impact of Sleep Apnea Syndrome in the Evolution of Acute Coronary Syndrome. Effect of Intervention with Continuous Airway Pressure*

MMP9: metaloproteasa de la matriz-9

NO: óxido nítrico

NSTEMI: infarto de miocardio sin elevación del segmento ST

Nt-proBNP: región amino-terminal del péptido natriurético cerebral

PCR: proteína C-reactiva

PIGF: factor de crecimiento placentario

PSG: polisomnografía

RDI: índice de alteración respiratoria

ROS: especies reactivas de oxígeno

REM: movimiento rápido de los ojos

SAHS: síndrome de apneas-hipopneas del sueño

SAVE: *Sleep Apnea CardioVascular Endpoints Study*

SCA: síndrome coronario agudo

sFlt1: tirosina quinasa fms-like 1 soluble

STEMI: infarto de miocardio con elevación del segmento ST

VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular

Esta tesis está presentada como un compendio de tres artículos de investigación multicéntricos. Dos de ellos han sido previamente publicados en revistas internacionales indexadas en el *Journal Citations Report*, y el tercero está bajo revisión.

Las referencias son las siguientes:

- Barcelo A, **Bauça JM**, Yañez A, Fueyo L, Gomez C, de la Peña M, *et al.* Impact of Obstructive Sleep Apnea on the Levels of Placental Growth Factor (PIGF) and Their Value for Predicting Short-Term Adverse Outcomes in Patients with Acute Coronary Syndrome. *PLoS ONE* 2016 11(3):e0147686. doi:10.1371/journal.pone.0147686.
 - Impact factor 2016: 2,81 (Q1)
 - 5-year impact factor: 3,39
 - *Eigenfaktor* normalizado: 220,55

- **Bauça JM**, Yañez A, Fueyo L, de la Peña M, Pierola J, Sánchez-de-la-Torre A, *et al.* Cell Death Biomarkers and Obstructive Sleep Apnea: Implications in the Acute Coronary Syndrome. *Sleep* 2017 1;40(5). doi: 10.1093/sleep/zsx049.
 - Impact factor 2016: 4,62 (Q1)
 - 5-year impact factor: 5,67
 - *Eigenfaktor* normalizado: 2,99

- **Bauça JM**, Barcelo A, Fueyo L, Sanchis P, Pierola J, de la Peña M, *et al.* Biomarker panel in sleep apnea patients after a coronary event [en revisión]

ÍNDICE DE CONTENIDO

1. RESUMEN.....	14
1.1. Resum en català	16
1.2. Resumen en castellano	17
1.3. Abstract in English	18
2. INTRODUCCIÓN.....	20
2.1. EL SÍNDROME DE APNEAS-HIPOPNEAS DEL SUEÑO	22
2.1.1. Introducción	22
2.1.2. Fisiopatología de la apnea obstructiva del sueño	22
2.1.2.1. Fisiología del sueño	22
2.1.2.2. Clasificación de los trastornos del sueño	24
2.1.2.3. Anatomía de la vía aérea y su papel en la apnea del sueño	24
2.1.2.4. Factores de riesgo	28
2.1.3. Epidemiología	34
2.1.4. Diagnóstico	35
2.1.5. Signos y síntomas clínicos	40
2.1.6. Tratamiento	42
2.2. RIESGO CARDIOVASCULAR Y SÍNDROME DE APNEAS DEL SUEÑO	45
2.2.1. Apnea obstructiva del sueño y sus consecuencias	45
2.2.2. Fisiopatología de la enfermedad cardiovascular en SAHS	47
2.2.2.1. Activación simpática	47
2.2.2.2. Estrés oxidativo	48
2.2.2.3. Inflamación sistémica	50
2.2.2.4. Función vascular/endotelial	51
2.2.2.5. Disfunción metabólica	51
2.2.2.6. Arteriosclerosis	53
2.2.3. Complicaciones cardiovasculares de la apnea del sueño	53
2.2.3.1. Hipertensión arterial	54
2.2.3.2. Insuficiencia cardíaca	55
2.2.3.3. Enfermedad coronaria isquémica	55
2.2.3.4. Arritmias	56
2.2.3.5. Ictus y accidente isquémico transitorio	56

2.2.3.6. Mortalidad	57
2.3. EL SÍNDROME CORONARIO AGUDO	59
2.3.1. Definición y clasificaciones	59
2.3.2. Fisiopatología y diagnóstico del infarto agudo de miocardio	61
2.3.3. Estrategias terapéuticas	62
2.3.4. Gravedad y pronóstico del infarto agudo de miocardio	64
2.3.5. Complicaciones y comorbilidades del infarto agudo de miocardio	65
2.3.5.1. Trastornos del ritmo cardiaco	65
2.3.5.2. Trastornos mecánicos	65
2.3.5.3. Otras complicaciones	66
2.3.5.4. Consecuencias a largo plazo	66
2.3.6. Infarto agudo de miocardio y síndrome de apneas del sueño	67
2.3.6.1. El ensayo clínico SAVE	67
2.3.6.2. El ensayo clínico ISAACC	69
2.4. BIOMARCADORES	72
2.4.1. Introducción	72
2.4.1.1. Definición de biomarcador	72
2.4.1.2. Estructura y clasificación	73
2.4.2. Biomarcadores metabólicos y de riesgo cardiovascular	76
2.4.3. Biomarcadores de muerte celular	78
2.4.4. Biomarcadores de inflamación	79
2.4.5. Biomarcadores hemodinámicos y relacionados con angiogénesis	81
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	84
3.1. Hipótesis del primer estudio	87
3.2. Hipótesis del segundo estudio	88
3.3. Hipótesis del tercer estudio	89
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	90
4.1. Primer estudio	93
4.1.1. Presentación del primer estudio	93
4.1.2. Resultados y discusión del primer estudio	94
4.2. Segundo estudio	108
4.2.1. Presentación del segundo estudio	108
4.2.2. Resultados y discusión del segundo estudio	109
4.3. Tercer estudio	120
4.3.1. Presentación del tercer estudio	120

4.3.2. Resultados y discusión del tercer estudio	121
5. CONCLUSIONES	152
6. BIBLIOGRAFÍA.....	156

1. RESUMEN

1.1. Resum en català

La síndrome d'apnees-hipopnees del son (SAHS) és una patologia multifactorial en la qual té lloc un estrenyiment intermitent de la via aèria durant el son i petits despertars per restablir el flux normal d'aire. Està relacionada amb un augment del risc cardiovascular, cerebrovascular, de malalties neurocognitives i amb una pitjor qualitat de vida.

La seva prevalença és especialment elevada en pacients amb patologia cardíaca, com la síndrome coronària aguda, una de les principals causes de morbiditat i mortalitat al voltant del món. Vista aquesta estreta relació, apareix la necessitat de comprendre millor els mecanismes moleculars que relacionen ambdues patologies.

Com que els marcadors bioquímics, o biomarcadors, permeten estudiar processos fisiopatològics en fluids biològics de manera objectiva, la hipòtesi d'aquesta tesi és que la determinació de marcadors metabòlics, hemodinàmics, inflamatoris i de mort cel·lular poden ser útils per establir i avaluar els mecanismes subjacents que relacionen la SAHS amb la síndrome coronària aguda.

Els estudis que componen aquesta tesi deriven de l'assaig clínic multicèntric ISAACC, en què es van incloure individus que havien sofert una síndrome coronària aguda. Després de dur-se a terme un estudi de son, es va realitzar una extracció de sang venosa on es van quantificar múltiples biomarcadors relacionats amb el risc cardiovascular i es van registrar les principals variables antropomètriques i clíniques.

A través de la publicació de tres articles en revistes científiques es va demostrar que els nivells de factor de creixement placentari en aquests pacients estan associats amb la gravetat de l'infart de miocardi i amb la presència de SAHS i que l'increment dels nivells de biomarcadors relacionats amb la mort cel·lular podria estar relacionat amb l'augment del risc cardiovascular descrit en aquests individus.

D'altra banda, es va veure que la capacitat dels biomarcadors metabòlics, hemodinàmics i inflamatoris per a la predicció de la gravetat de la síndrome coronària aguda era independent de la presència de SAHS. En individus després d'un event coronari, la combinació de variables

antropomètriques i biomarcadors té un major poder de detecció de SAHS que els paràmetres individuals.

1.2. Resumen en castellano

El síndrome de apneas-hipopneas del sueño (SAHS) es una patología multifactorial en la que tiene lugar un estrechamiento intermitente de la vía aérea durante el sueño y pequeños despertares para restablecer el flujo normal de aire. Está relacionado con un aumento del riesgo cardiovascular, cerebrovascular, de enfermedades neurocognitivas y una peor calidad de vida.

Su prevalencia es especialmente alta en pacientes con patología cardíaca, como el síndrome coronario agudo, una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo. Dada su estrecha relación, aparece la necesidad de comprender mejor los mecanismos moleculares que relacionan ambas patologías.

Dado que los marcadores bioquímicos, o biomarcadores, permiten estudiar procesos fisiopatológicos en fluidos biológicos de manera objetiva, la hipótesis de esta tesis es que la determinación de biomarcadores metabólicos, hemodinámicos, inflamatorios y de muerte celular pueden ser útiles para establecer y evaluar los mecanismos subyacentes que relacionan el síndrome de apneas-hipopneas del sueño con el síndrome coronario agudo.

Los estudios que componen esta tesis derivan del ensayo clínico multicéntrico ISAACC, en el que se incluyeron individuos que habían sufrido un síndrome coronario agudo. Tras llevarse a cabo un estudio de sueño, se realizó una extracción de sangre venosa en la que se cuantificaron múltiples biomarcadores relacionados con el riesgo cardiovascular y se registraron las principales variables antropométricas y clínicas.

A través de la publicación de tres artículos en revistas científicas se demostró que los niveles del factor de crecimiento placentario en estos pacientes están asociados con la gravedad del infarto de miocardio y con la presencia de SAHS y que el incremento de los niveles de

biomarcadores relacionados con la muerte celular podría estar relacionado con el aumento del riesgo cardiovascular descrito en estos individuos.

Por otra parte, se vio que la capacidad de los biomarcadores metabólicos, hemodinámicos e inflamatorios para la predicción de la gravedad del síndrome coronario agudo es independiente de la presencia de SAHS. En individuos tras un evento coronario, la combinación de variables antropométricas y biomarcadores en un algoritmo tiene mayor poder de detección de SAHS que los parámetros individuales.

1.3. Abstract in English

The obstructive sleep apnea syndrome (OSAS) is a multifactorial pathology that consists of an intermittent narrowing of the upper airway and arousals aiming to restore the normal airflow. It is related with an increase in the risk of cardiovascular, cerebrovascular and neurocognitive diseases, as well as a worse quality of life.

OSAS prevalence is especially high in patients with heart disease, including the acute coronary syndrome, one of the main causes of morbidity and mortality around the world. Therefore, it is of utmost importance to better understand the molecular mechanisms linking both pathologies.

Given that biochemical markers (or biomarkers) make possible the objective study of pathophysiological processes in biofluids, the hypothesis of this PhD thesis is that the determination of biomarkers of metabolism, hemodynamics, inflammation and cell death may be useful for the assessment and establishment of the underlying mechanisms that relate OSAS and the acute coronary syndrome.

The studies that constitute this thesis derive from the multicenter ISAACC clinical trial, which included patients who had experienced a coronary event. Anthropometrical and clinical variables were recorded, a sleep study was performed and venous blood was drawn for the quantification of cardiovascular-related biomarkers.

Thanks to the publication of three manuscripts in scientific journals, the blood levels of placental growth factor in these patients were shown to be related with the severity of the myocardial infarction and with the presence of OSAS, and that the increase of cell death-related biomarkers could be associated with the increase of cardiovascular risk seen in these individuals.

In addition, the capacity of metabolic, hemodynamics and inflammation-related biomarkers for the prediction of the severity of the acute coronary syndrome is independent of the presence of OSAS. In these patients, the combination of anthropometric variables and biomarkers by means of an algorithm has a greater power for the detection of OSAS than the individual parameters.

2.INTRODUCCIÓN

2.1. EL SÍNDROME DE APNEAS-HIPOPNEAS DEL SUEÑO

2.1.1. Introducción

La apnea del sueño es una entidad clínica englobada dentro de los trastornos de la respiración que ocurren durante el sueño. Por su origen, puede clasificarse en apnea central del sueño (CSA, por sus siglas en inglés: *central sleep apnea*) y apnea obstructiva del sueño (OSA, *obstructive sleep apnea*)¹.

La apnea obstructiva del sueño es la causa más frecuente de la somnolencia durante el día, además de ser una fuente relevante de deterioro de la calidad de vida, absentismo laboral, complicaciones y mortalidad alrededor del mundo. Esta enfermedad respiratoria altamente prevalente consiste en un colapso repetido de la faringe durante el sueño por causas anatómicas o funcionales^{1,2}. Este colapso de la vía aérea, total o parcial, conlleva a una hipoxemia intermitente, hipercapnia y fragmentación del sueño, los cuales contribuyen a las principales consecuencias de la apnea obstructiva del sueño: a nivel cardiovascular, metabólico y neurocognitivo³.

2.1.2. Fisiopatología de la apnea obstructiva del sueño

2.1.2.1. Fisiología del sueño

El sueño es un proceso fisiológico vital que presenta funciones de reconstitución imprescindibles para el funcionamiento óptimo del organismo durante el día⁴. La necesidad de dormir va disminuyendo a lo largo de la infancia y la adolescencia, llegando a un valor de 7-8 horas en la edad adulta. Incluso hay evidencias de una disminución paulatina de las horas de sueño desde la edad adulta joven a la vejez⁴.

La monitorización de la actividad cerebral cortical mediante electroencefalografía (EEG) ha permitido un mejor conocimiento del sueño, así como su clasificación en sueño sin movimiento rápido de ojos (NREM, *non-rapid eye movement*) y sueño con movimiento rápido de ojos (REM, *rapid eye movement*). La fase NREM se puede subdividir en tres fases: N1, N2 y N3, correspondientes a una profundidad de sueño creciente y diferenciadas mediante una frecuencia encefalográfica específica⁴. El sueño suele progresar de N1 a N3, seguido de un periodo de fase REM. En la fase REM suelen apreciarse ondas de poco voltaje y elevada frecuencia en el EEG, además de una mayor atonía muscular. Este ciclo de sueño descrito puede estar interrumpido por pequeños microdespertares (que duran unos 3 segundos), o despertares (periodos de insomnio superiores a 30 segundos)⁴. Un incremento de la fase N1 suele indicar aumento en la fragmentación de sueño.

El sueño tiene importantes efectos sobre el sistema respiratorio y sobre el control de la respiración. Un sueño normal proporciona al organismo un periodo de bajo estrés fisiológico y, como consecuencia, oxidativo, lo que supone una ventaja para todo el sistema vascular. Durante la fase no-REM del sueño se reduce la actividad simpática y aumenta la actividad parasimpática, disminuyendo así tanto la presión arterial como el ritmo cardiaco¹. Un sueño insuficiente o de mala calidad se ha relacionado con deterioro cognitivo⁵, disfunción de algunos órganos y enfermedades crónicas, así como una mayor mortalidad^{6,7}. En individuos con enfermedades respiratorias del sueño, la frecuencia de colapsos totales o parciales suele ser mayor durante el sueño REM, dado que la actividad de los músculos esqueléticos está especialmente reducida⁸.

A lo largo de las últimas décadas en el mundo occidental, se ha evidenciado una disminución tanto en la calidad como en la cantidad de sueño, de hecho, en un estudio se vio que únicamente el 3% de los niños realmente dormían las 9 horas recomendadas por noche⁹.

2.1.2.2. Clasificación de los trastornos del sueño

La clasificación diagnóstica de los diferentes trastornos relacionados con el sueño es esencial para estandarizar definiciones y mejorar los algoritmos para su diagnóstico diferencial, así como para su tratamiento.

En la tercera versión de la *International Classification of Sleep Disorders (ICSD-3)*¹⁰ se incluyen siete categorías principales:

- Insomnio
- Trastornos respiratorios relacionados con el sueño
- Trastornos de hipersomnolencia central
- Trastornos del ritmo circadiano sueño-vigilia
- Parasomnias
- Trastornos del movimiento relacionados con el sueño
- Otros trastornos del sueño

Dentro del grupo de los trastornos respiratorios relacionados con el sueño, se propone una subdivisión en cuatro entidades diferentes:

- Síndromes de apnea central del sueño (con o sin respiración de Cheyne-Stokes, por gran altitud, primaria, primaria de la infancia...)
- Síndromes de apnea obstructiva del sueño (del adulto o pediátrica)
- Alteraciones de hipoventilación relacionados con el sueño (por obesidad, debida a un medicamento, debida a otro trastorno médico, alveolar central idiopática...)
- Trastorno de hipoxemia relacionada con el sueño
- Síntomas aislados y variantes normales (ronquido y catatrenia)

2.1.2.3. Anatomía de la vía aérea y su papel en la apnea del sueño

La apnea obstructiva del sueño se caracteriza por episodios repetidos de obstrucción de la vía aérea superior durante el sueño. Esta obstrucción de la ventilación conduce a una reducción

en la presión parcial de oxígeno arterial (hipoxemia), que implica un descenso en la saturación de la hemoglobina, un incremento en la presión parcial de dióxido de carbono (hipercapnia), un aumento de los esfuerzos respiratorios y un ligero despertar, todo ello para conseguir reabrir la vía aérea y reoxigenar rápidamente¹¹. La fragmentación del sueño y los repetidos ciclos de hipoxia-reoxigenación son los dos factores clave que producirán los síntomas clínicos y las complicaciones de la enfermedad.

2.1.2.3.1. Anatomía y colapsabilidad de la vía aérea superior

A diferencia de la tráquea y los bronquios (la permeabilidad de los cuales se mantiene mediante un soporte cartilaginoso) y las vías aéreas menores intrapulmonares (cuya permeabilidad se mantiene por la elasticidad del parénquima pulmonar circundante), la vía aérea superior está compuesta solamente por varios músculos y tejido blando^{8,12}. Durante el estado de vigilia, estos músculos de la vía aérea superior se activan de manera continua, pero durante el sueño su potencia muscular disminuye⁸.

Esta dependencia crítica de la acción del músculo dilatador predispone más fácilmente a un posible colapso u obstrucción en personas susceptibles. Así, es intuitivo que una vía aérea de un mayor calibre sea más difícil de colapsar que una vía aérea estrecha. El conducto se puede colapsar a diferentes niveles: el paladar, la base de la lengua, las paredes laterales faríngeas y la zona de la epiglotis.

En individuos obesos, la deposición de grasa en la zona parafaríngea puede ayudar a reducir el diámetro del paso de aire, y además en varios estudios se ha hallado una mayor deposición a edades mayores independientemente del índice de masa corporal^{13,14,15}.

De la misma manera, la longitud de la vía aérea también se ha descrito como un factor predisponente en la patogénesis de la apnea del sueño, especialmente en hombres¹⁶; longitudes mayores de la vía aérea aumentan la tendencia al colapso.

Si existe resistencia nasal, por presencia de pólipos o por desviación del tabique, ésta afecta a dos niveles facilitando la obstrucción: por una parte reduce la presión negativa de succión y por

otra favorece que se abra la boca permitiendo que la lengua caiga hacia la parte posterior y obstruya el canal respiratorio⁸.

2.1.2.3.2. Actividad muscular dilatadora de la vía aérea superior

No hay muchos estudios que hayan estudiado la actividad del músculo dilatador de la faringe en estos pacientes. La capacidad del músculo geniogloso de responder a incrementos en la presión negativa de la faringe es importante para evitar el colapso^{4,13}.

2.1.2.3.3. Volumen pulmonar

Un mayor volumen pulmonar permite aplicar una mayor fuerza de tracción caudal sobre la tráquea y la laringe, impidiendo la obstrucción oral por reducción de la presión intraluminal necesaria para abrir y cerrar la vía aérea superior. También disminuye la presión que ejercen los tejidos parafaríngeos sobre la propia vía aérea^{4,17}.

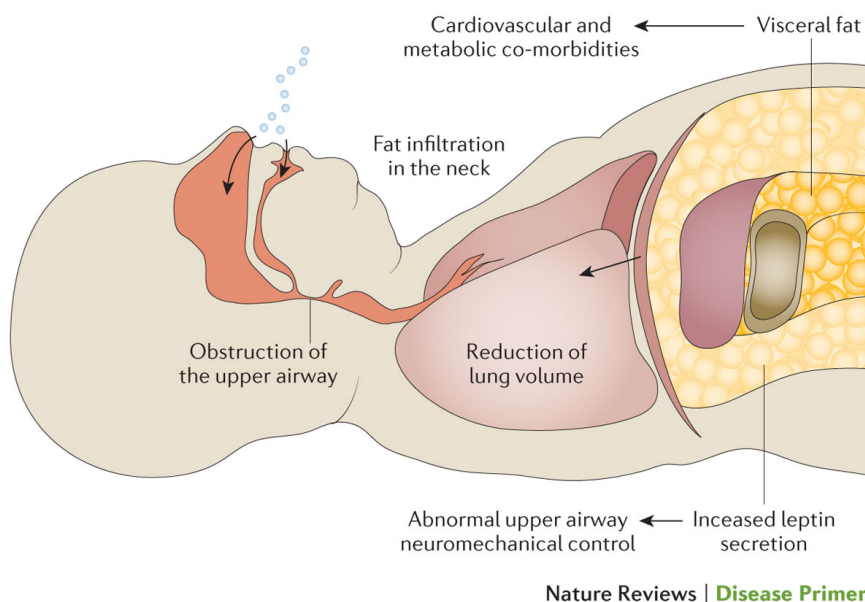


Figura 1. Lévy P. *et al.* (*Nat Rev Dis Primers* 2015). Reducción del volumen pulmonar y obstrucción de la vía aérea superior por deposición de grasa abdominal.

Por una parte, la remodelación del parénquima pulmonar con la edad compromete la mecánica ventilatoria al reducir la elasticidad (enfisema senil) y, por otra, la deposición de grasa en la zona abdominal superior en pacientes obesos puede reducir el volumen y con ello la capacidad funcional residual, especialmente en decúbito. Las evidencias actuales sugieren que los incrementos en el volumen pulmonar expiratorio final pueden jugar un papel protector de la vía aérea^{18,19}.

2.1.2.3.4. Volumen de líquido en la zona superior

La acumulación y consiguiente redistribución de líquidos puede jugar un papel importante en la fisiopatogénesis de la apnea del sueño²⁰. Se ha visto que los individuos con patologías relacionadas con la retención de líquidos tienen una mayor predisposición al desarrollo de apneas del sueño, tanto centrales como obstructivas²¹. Esta retención de líquidos puede observarse en la insuficiencia cardíaca o la enfermedad renal crónica. Por ejemplo, el líquido puede acumularse en los espacios intravasculares e intersticiales de las extremidades inferiores durante el día (edema) debido a la fuerza de la gravedad, de manera que al acostarse por la noche tiene lugar una redistribución hacia la zona de la cara, el cuello o incluso el espacio pleural. En especial, la acumulación de líquido en el cuello durante el sueño puede aumentar la presión para colapsar la vía aérea²². La acumulación en el pecho puede provocar congestión pulmonar, lo que conducirá a situaciones de hiperventilación e hipocapnia²⁰.

2.1.2.3.5. Umbral de microdespertar

Los microdespertares (*arousals*) son un mecanismo fisiológico protector que permite reabrir una vía aérea colapsada, y tienen lugar cuando el flujo ventilatorio alcanza un cierto umbral. Esto es, cuando se detecta un aumento de la presión de CO₂ (hipercapnia) durante el sueño, el sistema nervioso central despierta, provocando así que el individuo pase de un sueño más profundo a uno más ligero o incluso a la situación de vigilia⁸. Este fenómeno permite recuperarse de la hipoxemia relacionada con las apneas o hipopneas y, al ser relativamente

cortos en el tiempo (3-15 segundos), pueden no ser percibidos por el propio individuo a pesar de causar fragmentación del sueño².

El valor de presión de CO₂ a partir del cual el sistema nervioso central provoca este microdespertar (umbral de microdespertar) varía de un individuo a otro. Los individuos con umbrales menores tienen mayor tendencia a despertarse, reduciendo así la duración del colapso y la magnitud de desaturación de la oxihemoglobina.

2.1.2.3.6. Estabilidad del control respiratorio

La estabilidad del control ventilatorio mide la relación entre la magnitud de la respuesta ventilatoria compensadora y la magnitud de la perturbación que la ha provocado. A modo de ejemplo, la caída de presión de oxígeno arterial durante una hipopnea produce un incremento de la ventilación como mecanismo de compensación; cuando la magnitud de ese incremento es mayor que la hipopnea inicial, tiene lugar la respiración inestable, con una amplitud oscilante. En el control de la estabilidad de la respiración intervienen los quimiorreceptores, la sensibilidad de los cuales puede variar en función de ciertos parámetros antropométricos, como la edad²³.

2.1.2.4. Factores de riesgo

A la idea tradicional de que la apnea obstructiva del sueño era un problema únicamente de la anatomía de la vía aérea superior, en el que la estructura craneofacial o la grasa corporal disminuían el tamaño de la luz de la vía respiratoria facilitando un posible colapso de la faringe, hay que añadir otros factores no anatómicos ni neuromusculares que también contribuyen al desarrollo de la patología^{3,24,25}.

Los principales factores de riesgo para el desarrollo de apneas del sueño son la obesidad, el género masculino y la edad¹¹. Le siguen algunos atributos físicos como una disminución de las

dimensiones de la orofaringe, la diabetes mellitus tipo 2, el hipotiroidismo, o un estado postmenopáusico en mujeres.

Figura 2. Factores de riesgo de la apnea del sueño.



Por su parte, en niños, los principales factores que contribuyen al desarrollo de SAHS incluyen la hipertrofia amigdalara, la obesidad y el dimorfismo creaneofacial²⁶. De hecho, la prevalencia creciente de obesidad en la edad pediátrica está asociada con un aumento en la incidencia de SAHS².

2.1.2.4.1. Obesidad

Un índice de masa corporal (IMC) excesivo justifica entre el 40% y el 60% de los casos de síndrome de apnea del sueño¹. En individuos obesos, los depósitos de grasa en la zona parafaríngea reducen el calibre de la luz de la vía aérea. Asimismo, se reduce tanto la elasticidad del parénquima pulmonar como el volumen del propio pulmón, lo que lleva a una reducción de la fuerza de tracción sobre las estructuras de las vías respiratorias altas.

De hecho, el riesgo de SAHS incrementa progresivamente con el IMC y todavía más con la circunferencia del cuello^{27,28}. Así, como consecuencia de esta asociación, se encuentra una mayor prevalencia de SAHS en aquellos países con mayor porcentaje de individuos obesos²⁹. Por eso, si se pudiera hablar de prevención del SAHS, la obesidad sería la principal variable para considerar. La reducción del sobrepeso, mediante dieta o por cirugía bariátrica, ha demostrado ser la manera más efectiva para reducir el desarrollo o progresión de la apnea del sueño, a la vez que el tratamiento con CPAP para el SAHS facilita la reducción de peso^{2,30,31}. De hecho, varios autores han descrito que la obesidad y las apneas del sueño podrían representar dos caras de la misma moneda, y no deberían entenderse como dos entidades clínicas separadas sino totalmente interrelacionadas que se potencian recíprocamente^{32,33}.

2.1.2.4.2. Género

Junto con la obesidad, el género masculino es el principal factor de riesgo de desarrollar apnea obstructiva del sueño y, a diferencia de la primera, no se conocen sus mecanismos predisponentes¹⁶. Se ha visto que la prevalencia de apneas del sueño es entre 2 y 4 veces superior en hombres que en mujeres⁸.

Los hombres tienden a acumular peso de una manera más central que las mujeres (patrón androgénico), y este depósito de tejido adiposo tanto en el abdomen como cerca de las vías aéreas podría favorecer la compresión de éstas. Se ha descrito una reducción de volumen pulmonar con el aumento de grasa central⁹. De manera paralela, la influencia de las hormonas

sexuales en las mujeres premenopáusicas las protege relativamente, hecho que se revierte cuando se alcanza la menopausia, llegando a alcanzar una incidencia de eventos apneicos similar al género masculino.

Anatómicamente, la faringe masculina presenta un igual o mayor diámetro de la luz que en mujeres y una vía aérea de mayor longitud^{16,34,35}. Por una parte, el mayor diámetro incrementa la facilidad de paso del aire, así que la alteración de la vía aérea causada por deposición de grasa es menos importante que en mujeres, lo que podría proteger frente a los eventos de obstrucción. En cambio, por otra, la mayor longitud (que es independiente de la masa corporal) sí podría explicar la mayor propensión a un posible colapso en hombres.

Además, el género femenino suele presentar una mayor respuesta respiratoria bajo carga (mayor ventilación durante una carga respiratoria resistiva), y mayor presión de colapso de la vía aérea faríngea pasiva. Tomado en conjunto, ello lleva a pensar en que los factores anatómicos predisponen más a los hombres a un colapso faríngeo que a las mujeres^{3,36}.

2.1.2.4.3. Edad

La edad es el tercer factor principal predisponente al desarrollo de apneas obstructivas del sueño. Se considera que la incidencia del síndrome de apneas-hipopneas del sueño (SAHS) en la población general aumenta linealmente hasta los 60-65 años³⁷, con una prevalencia de individuos con un índice de apneas-hipopneas (IAH) $>5 \text{ h}^{-1}$ que puede llegar al 80%³². Ancoli-Israel y sus colaboradores describieron un 62% de individuos mayores de 60 años de su comunidad con un IAH superior a 10 h^{-1} , cuyos hallazgos son consistentes con los del Sleep Heart Health Study, uno de los mayores estudios epidemiológicos hasta día de hoy.

El diagnóstico de SAHS se puede realizar a cualquier edad, pero la mayoría de pacientes son diagnosticados entre los 40 y 50 años^{2,27}. Los individuos de edades más avanzadas suelen presentar mayor pérdida de elasticidad, lo que conduce a una disminución de la fijación de la

vía aérea superior^{3,4,38}. La fuerza de los músculos dilatadores de la vía aérea superior disminuye también con la edad. Una peor calidad del sueño puede ser la causante de una mayor facilidad para despertarse (menor umbral de arousal), y la pérdida de colágeno lleva a una vía aérea más fácilmente compresible.

Además de cambios anatómicos, con la edad se producen modificaciones en los patrones típicos de sueño. Entre ellos se encuentran un menor tiempo total de sueño, retraso en la aparición de sueño, incremento de las siestas o pausas durante el día, incremento del número de despertares o microdespertares, alargamiento del tiempo de las fases N1 y N2 (fases menos profundas del sueño NREM), disminución de la duración de la fase REM y del sueño de ondas lentas, cambios en el ritmo circadiano (a mayor edad, más temprano se da el sueño y el despertar) y un menor número de ciclos de sueño por noche^{4,39,40}.

De hecho, en un estudio con adultos mayores, entre un 13-45% afirmaron tener dificultades para conciliar el sueño, un 20-65% afirmaron padecer sueño fragmentado y un 15-54% se levantaba muy pronto por la mañana⁴¹.

2.1.2.4.4. Etnia

La prevalencia más elevada de SAHS se ha descrito para los afroamericanos. También se ha propuesto un mayor porcentaje de casos entre hispanos e indios americanos, mientras que la prevalencia en la etnia asiática es comparable a la caucásica⁴². De hecho, se encontró un riesgo de hasta 6 veces mayor de desarrollar SAHS en niños afroamericanos que en niños caucásicos⁴³, y un 88% en adultos menores de 26 años en comparación con una población similar blanca⁴⁴.

Para comprender el porqué de esta heterogeneidad racial, se requiere entender el conjunto de factores de riesgo, principalmente los antropométricos, y su contribución a la patogenicidad del SAHS. Además de la obesidad (más prevalente en etnia afroamericana)⁴², el ejemplo más claro es la forma craneofacial. La superficie de la lengua es considerablemente mayor en

afroamericanos que en caucásicos, lo que puede facilitar la obstrucción; y los asiáticos presentan una base craneal menor y diferente longitud de la mandíbula que el resto de razas^{45,46}.

2.1.2.4.5. Otros factores de riesgo

Algunas variables que también pueden influir en el desarrollo de SAHS es la presencia de edemas en extremidades inferiores, la retrognatia y micrognatia, menopausia, antecedentes familiares de apnea del sueño, síndromes genéticos que reduzcan el diámetro de la vía aérea superior (por ejemplo, síndrome de Down, síndrome de Treacher-Collins), hipertrofia amigdalal, hipotiroidismo, acromegalia y otros síndromes endocrinos⁸.

Asimismo, el alcoholismo y el tabaquismo también incrementan el número y la duración de las apneas. En concreto, el hábito alcohólico tiene un efecto dual en la reducción del tono de los músculos implicados en la respiración y en la depresión del centro respiratorio⁴⁷.

La importancia de los factores genéticos en el desarrollo de SAHS se demuestra al observar que la prevalencia de la enfermedad en familiares de primer grado de individuos con esta patología respiratoria es el doble que en familiares de primer grado de controles sanos⁴⁸, y este riesgo aumenta con el número de familiares afectos.

Dado la estrecha relación entre el SAHS y otras patologías respiratorias y cardiovasculares, existen condiciones que deberían hacer sospechar de apnea del sueño, como son la hipertensión refractaria, la angina nocturna, las arritmias nocturnas (incluyendo la fibrilación auricular y la bradicardia), el accidente isquémico transitorio y la insuficiencia cardiaca congestiva¹¹. Este apartado se desarrollará en posteriores capítulos.

2.1.3. Epidemiología

El SAHS es un problema de salud pública global y uno de los trastornos respiratorios crónicos más frecuentes. Se calcula que afecta entre un 4-17% de las mujeres, y un 9-34% de los hombres, aunque con gran variabilidad entre estudios y regiones^{11,29}. Además, los resultados de los estudios de prevalencia se deben interpretar con cautela, por una parte, debido al infradiagnóstico y, por otra, debido al elevado porcentaje de individuos sin apneas que refiere somnolencia diurna excesiva^{2,49}. Varios estudios poblacionales indican que la prevalencia de este síndrome es significativamente mayor en pacientes con enfermedad cardiovascular concomitante; por ejemplo, en dos tercios de pacientes con hipertensión refractaria, síndrome coronario agudo o ictus^{2,50}. También se ha hallado en casi la mitad de pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva crónica.

El primer estudio poblacional que investigó sobre la prevalencia de la apnea obstructiva del sueño fue el Wisconsin Sleep Cohort Study, de 1993³⁷. En él se describió una prevalencia de apnea del sueño (definida como IAH ≥ 5 h⁻¹) en el 9% de mujeres de mediana edad (30-60 años) y un 15% de hombres, y una prevalencia de apnea clínicamente importante (IAH ≥ 15 h⁻¹) en el 4% de mujeres y 5% de hombres. No obstante, estudios posteriores han arrojado valores todavía superiores, alcanzando un 10% en mujeres y 20% en hombres, probablemente debido a un incremento en la incidencia de obesidad (principal factor de riesgo de SAHS) y a una mejora con el tiempo en la cobertura sanitaria y en tecnología para el diagnóstico^{3,29}. Los propios investigadores de Wisconsin describieron un aumento de la prevalencia de SAHS entre 14-55% en la década de los años 90^{2,29}. Actualmente, la apnea obstructiva del sueño es considerada un problema de salud global. Se ha visto que algunos países asiáticos o Brasil presentan prevalencias similares a las de Estados Unidos o Europa a pesar de un menor porcentaje de ciudadanos obesos³.

En población pediátrica, la prevalencia de SAHS es muy inferior a la observada en adultos, llegando al 5,7%, aunque la incidencia creciente de la obesidad en este grupo de edad hace

prever un incremento paralelo en el desarrollo de SAHS²⁶. Los principales síntomas que se aprecian en pediatría son ligeramente diferentes a los de la población adulta, ya que no suele observarse somnolencia diurna, sino más bien hiperactividad, problemas de comportamiento y dificultad de aprendizaje, así como nicturia y, frecuentemente, ronquido no estacional². Además, en contraposición a lo que ocurre en la gente mayor, la amigdalectomía o adenoidectomía suele suponer un tratamiento muy efectivo para casi la mitad de los niños con SAHS.

La apnea del sueño se ha descrito como un factor de riesgo modificable de hipertensión sistémica, a la vez que está asociada a una mayor incidencia de enfermedad cerebrovascular, insuficiencia cardíaca, fibrilación auricular y enfermedad coronaria¹. De hecho, la apnea obstructiva del sueño, especialmente en el grado severo, está relacionada con una mayor mortalidad por todas las causas, así como mortalidad cardiovascular.

2.1.4. Diagnóstico

Como cualquier patología, una correcta anamnesis y una exploración física correcta es fundamental para orientar el diagnóstico. Algunos aspectos básicos a considerar durante la valoración clínica del individuo con sospecha de posible patología respiratoria del sueño son los siguientes⁵¹:

- Antecedentes de interés (especialmente cardiopulmonares)
- Clínica relacionada con el SAHS (somnolencia)
- Hábitos de sueño (horario, siestas)
- Variables antropométricas (IMC, perímetro del cuello y cintura)
- Distancia hioides-mandíbula
- Exploración otorrinolaringológica básica (obstrucción nasal, hipertrofia amigdalal o úvula, paladar blando largo, grados de Mallanpati, examen maxilar, calidad de la mordida)

- Auscultación cardiopulmonar
- Tensión arterial

La normativa también recomienda la solicitud de un análisis de sangre como prueba complementaria, incluyendo un hemograma, bioquímica básica y perfil lipídico. Aunque la valoración clínica exhaustiva y la exploración física de los individuos sean imprescindibles, ninguno de los parámetros ha demostrado suficiente poder diagnóstico para SAHS, de forma que es necesaria la realización de un estudio de sueño⁵¹.

El método de referencia (*gold standard*) utilizado para el diagnóstico de la apnea del sueño es la denominada polisomnografía completa durante toda la noche (PSG), realizada en una unidad hospitalaria especializada¹.

Este procedimiento diagnóstico incluye, de forma continua, un registro de datos neurofisiológicos, cardíacos y respiratorios relacionados con el sueño². La monitorización del sueño-vigilia se realiza por medio de un electroencefalograma (EEG), un electrooculograma izquierdo y derecho (EOG) y una electromiografía mandibular (EMG). Los registros respiratorios incluyen una electrocardiografía (ECG), registros de la presión del flujo aéreo nasal y del ronquido, medidas del esfuerzo respiratorio (estudio pletismográfico del movimiento torácico y abdominal) y la oximetría arterial periférica. Además, se suelen añadir sensores en la zona tibial anterior para evaluar la posición del cuerpo y los movimientos periódicos de las piernas. Un profesional especializado es el encargado de la interpretación manual de los registros de la PSG. La evaluación de los eventos respiratorios se basa en unos criterios estandarizados de medición de flujo aéreo, movimientos toraco-abdominales y señales de oximetría^{3,11}.

A pesar de ofrecer un diagnóstico definitivo, la PSG es una técnica cara, que consume tiempo, difícil de manejar y que exige personal experto. En los casos de acceso limitado a una PSG, existe la posibilidad de realizar estudios de sueño simplificados mediante dispositivos portátiles:

la poligrafía ambulatoria que, a diferencia de la PSG, no incluye registros neurofisiológicos^{1,2}. Estos dispositivos suelen permitir el registro ambulatorio de la saturación de oxígeno, que se consideran una buena aproximación al diagnóstico, dado que facilitan la detección de las desaturaciones de oxígeno que acompañan a cada evento apneico. Aunque no permiten una correcta distinción entre las apneas obstructivas y las de origen central, varios estudios aseguran que el diagnóstico y tratamiento realizados mediante dispositivos en el hogar del paciente no son peores que aquellos realizados en laboratorios especializados. De todas formas, en estos estudios no se han incluido pacientes de difícil manejo (con insuficiencia cardíaca, enfermedad pulmonar o neuromuscular), enfatizando así el hecho de que el estudio ambulatorio no es apto para cualquier caso³. Por ejemplo, algunos autores recomiendan la realización de una poligrafía ambulatoria únicamente en aquellos pacientes con elevada probabilidad de presentar la patología^{47,52}.

Las definiciones de los eventos respiratorios están basadas en consensos, y los criterios pueden variar en función del centro de estudio. Tal variabilidad puede afectar la interpretación de los estudios de sueño y tener un impacto negativo en el seguimiento de pacientes en tratamiento⁵³. De ahí el requerimiento de personal entrenado y actualizado. En este trabajo, se expondrán las últimas consideraciones de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR), publicadas en 2011⁵¹.

Se define apnea obstructiva como la ausencia o reducción superior al 90% de la señal respiratoria de más de 10 segundos de duración en presencia de esfuerzo respiratorio. Se considera esfuerzo respiratorio a una secuencia de respiraciones de más de 10 segundos con resistencia de la vía aérea superior (detectada por una reducción en la señal de presión nasal) seguida de un microdespertar encefalográfico, también llamado *arousal*. La diferencia entre apneas obstructivas y apneas centrales radica en la ausencia de esfuerzo respiratorio en las últimas.

La definición de hipopnea no es universal y se define como la asociación de:

- La disminución de la ventilación a un valor entre 30% y 90% del valor basal de la amplitud de la señal respiratoria que dura un mínimo de 10 segundos, o bien la disminución notoria del movimiento toracoabdominal.
- Disminución de la saturación de la oxihemoglobina (SatO₂) igual o superior al 3% o un arousal.

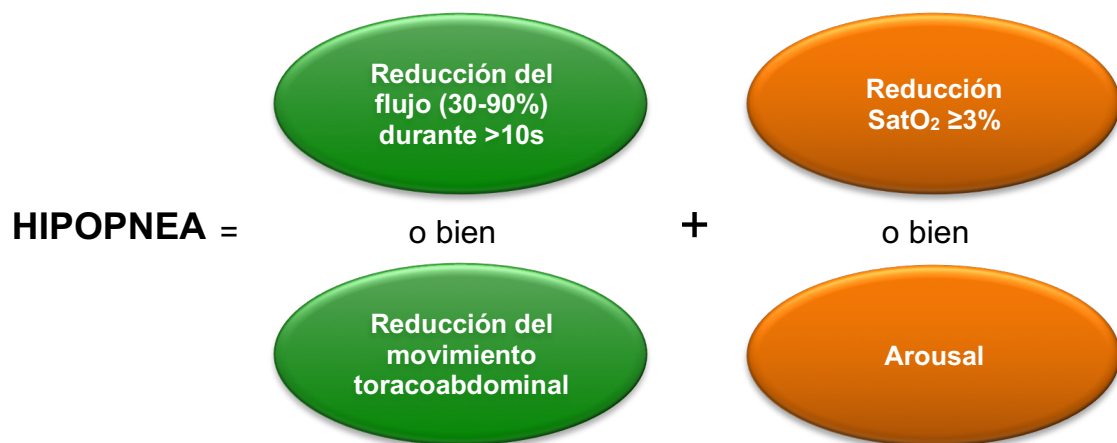


Figura 3. Definición de hipopnea, de acuerdo con la recomendación SEPAR⁵¹.

La principal magnitud para la clasificación de la gravedad de la apnea del sueño es el índice de apnea-hipopnea (IAH), que se calcula como la suma del número de apneas e hipopneas que se producen por hora de sueño, y se expresa en unidades de h⁻¹. Existen otros parámetros, como el índice de alteración respiratoria (RDI, *Respiratory Disturbance Index*), que se diferencia del IAH en que también se incluye el número de arousals relacionados con el esfuerzo respiratorio en su cálculo. A nivel práctico, se suele considerar IAH como equivalente a RDI.

Como síndrome, la apnea obstructiva del sueño se define no solo con base en los datos de los estudios de sueño, sino también a partir de los síntomas nocturnos y diurnos⁸. La primera vez que se habló del "síndrome de apnea obstructiva del sueño" fue en 1976 por Guilleminault y colaboradores, para referirse a individuos con apneas obstructivas y somnolencia diurna^{54,55}.

De acuerdo con el Documento Nacional de Consenso sobre el síndrome de apnea-hipopnea del sueño⁵¹, esta entidad clínica se define actualmente como RDI >5 h⁻¹ junto con uno de los siguientes (A o B):

- A. Somnolencia diurna excesiva no explicada por otras causas.
- B. Dos o más de los siguientes criterios:
 - Asfixias repetidas durante el sueño
 - Despertares recurrentes durante el sueño
 - Percepción del sueño como no reparador
 - Cansancio o fatiga durante el día
 - Dificultades de concentración

Se recomienda la terminología “síndrome de apnea-hipopnea del sueño”, puesto que incluye hipopneas no solamente obstructivas⁵⁴. Por convención, en la población adulta se ha establecido la clasificación de la gravedad del síndrome como:

- IAH 5-15 h⁻¹: SAHS leve
- IAH 15-30 h⁻¹: SAHS moderado
- IAH >30 h⁻¹: SAHS grave

En población pediátrica, con un número de eventos respiratorios mucho menor, se utilizan criterios diagnósticos diferentes. Según bibliografía reciente, podría considerarse el diagnóstico de apnea del sueño en individuos de edades comprendidas entre 2-18 años que presenten un valor de IAH superior a 5 h⁻¹; o bien aquellos con IAH >1 h⁻¹ con presencia de comorbilidades o factores de persistencia de respiración alterada durante el sueño⁵⁶. Actualmente, se asume que la prevalencia en estos pacientes está comprendida entre 1-5%, y puede aparecer en cualquier edad^{26,57}.

Por su parte, la magnitud de la somnolencia diurna puede medirse de forma subjetiva mediante cuestionarios, o de forma objetiva. La más utilizada de forma rutinaria es la Escala de Somnolencia de Epworth (ESS, *Epworth Sleepiness Scale*)⁵⁸, y se trata de una medida subjetiva que evalúa mediante un cuestionario la posibilidad de un individuo para quedar

dormido en diferentes situaciones cotidianas en las que la mayoría de personas pueden verse involucradas, como por ejemplo viendo la televisión, sentado en un ambiente tranquilo después de comer o viajando como pasajero en un coche durante una hora. La puntuación se obtiene a partir de las frecuencias descritas para cada uno de los 8 ítems (0 = nunca, 3 = altamente frecuente). Un valor hasta 9 se considera normal; valores entre 10-15 suelen ser compatibles con apnea del sueño leve y debe referirse al paciente a un especialista. Valores por encima de 16 suelen indicar apnea del sueño grave o narcolepsia⁵⁹.

A pesar de ser la herramienta más sencilla y utilizada universalmente para la evaluación de la somnolencia diurna, su naturaleza subjetiva puede limitar la correcta percepción del grado de somnolencia antes del tratamiento⁶⁰. No se recomienda este cuestionario en algunos grupos poblacionales, como en ancianos, en pacientes con enfermedad renal crónica o en pacientes con insuficiencia cardíaca, debido a presentaciones atípicas de la enfermedad o a una menor prevalencia de síntomas visibles, como el ronquido^{52,60}.

Entre las pruebas objetivas se encuentran el test de latencia múltiple (MSLT, *multiple sleep latency test*), el test de mantenimiento de vigilia o el test de Osler. La técnica de referencia para el estudio de la hipersomnolencia es el MSLT, el cual permite discernir objetivamente entre el cansancio físico y la somnolencia diurna excesiva debido a patología psiquiátrica (narcolepsia, hipersomnia idiopática o recurrente, somnolencia por fármacos...) ^{61,62}. A pesar de ser el *gold estándar*, la dificultad en su realización y la necesidad de ser interpretada por especialistas hace que su uso en la práctica asistencial esté limitado a situaciones concretas⁶³.

2.1.5. Signos y síntomas clínicos

Las dos principales características distintivas para reconocer la enfermedad son un ronquido fuerte y disruptivo habitual, junto con somnolencia diurna excesiva. Se define como somnolencia diurna excesiva la propensión a quedarse dormido de forma involuntaria en situaciones no deseadas durante el día a pesar de la oportunidad de dormir correctamente y

con una duración adecuada. Por ello, la anamnesis es una etapa esencial en la evaluación de cualquier paciente con SAHS¹.

Aunque el ronquido no sea específico de la apnea del sueño, sí el hallazgo y descripción (generalmente por parte de la pareja) de episodios durante los cuales se para la respiración, seguidos de jadeos o resoplidos fuertes son de ayuda para el diagnóstico. Es frecuente que el propio paciente no sea consciente de los eventos apneicos, sino que únicamente suelen referir sequedad de boca al levantarse, fatiga diurna, falta de energía e incluso dolor de cabeza al despertarse¹.

Otros síntomas relacionados con la apnea obstructiva del sueño son el sueño no reparador, la nicturia (necesidad de despertarse para orinar), la enuresis (incontinencia urinaria), diaforesis (sudoración excesiva), pesadillas, despertares frecuentes, cefalea matutina, reflujo gastroesofágico, caídas frecuentes, libido reducida e impotencia^{11,51}. Además, los propios pacientes o sus familias a menudo reportan síntomas relacionados con la disfunción cognitiva y pérdida de memoria, lo que suele conllevar dificultades en el trabajo diario, desarmonía social y alteraciones emocionales¹², incluso irritabilidad, depresión y en algunos casos se puede apreciar una reducción de la calidad de vida, por ejemplo disminuyendo el rendimiento profesional y en los estudios.

Tiene especial importancia que los pacientes con apnea grave pueden quedarse dormidos cuando realizan actividades básicas de la vida diaria, como por ejemplo durante la conducción, de manera que suelen estar involucrados en accidentes de tráfico dos o tres veces más que la población general⁶⁴.

2.1.6. Tratamiento

Aunque existen varias estrategias terapéuticas, éstas suelen aliviar la sintomatología de manera ligera, y muchas veces no son bien toleradas por los pacientes. Por ello, además de investigar en nuevos tratamientos, es imprescindible concienciar al paciente de la importancia de la adherencia al tratamiento, como ocurre con un gran número de patologías crónicas³.

Además de las medidas higiénicas del sueño (alcohol, tabaco y fármacos) y de una buena dieta, la principal opción terapéutica actual para la apnea obstructiva del sueño es la presión positiva continua en la vía aérea (CPAP, *continuous positive airway pressure*). Esta presión continua de aire se administra a través de una máscara nasal sellada, y permite dilatar los conductos de la vía aérea superior y prevenir el colapso durante el sueño. La magnitud óptima de la presión continua que se administra se suele fijar mediante un control por PSG.

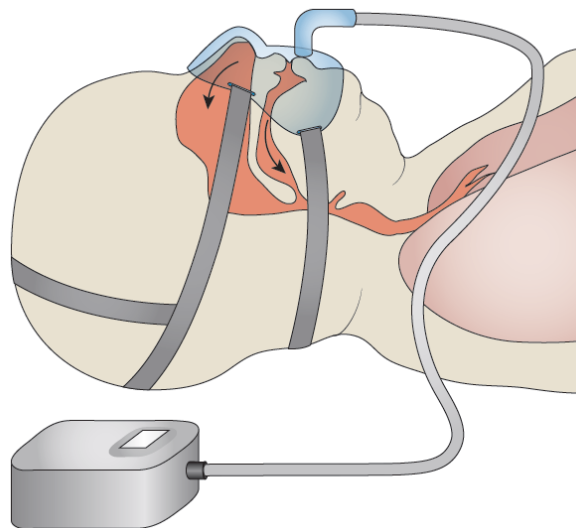


Figura 4. Lévy P. *et al.* (*Nat Rev Dis Primers* 2015).
Dispositivo para el tratamiento con CPAP.

También existen dispositivos de presión de aire positiva automática (APAP), que ajustan la presión mediante una monitorización continua de los patrones de flujo aéreo para eliminar eventos respiratorios. Actualmente, el APAP está recomendado únicamente como tratamiento

del SAHS sin comorbilidades mayores asociadas. Tampoco se recomienda para el tratamiento de las apneas de origen central¹.

Especialmente en pacientes no obesos, las características no relacionadas con la anatomía adquieren una importancia crucial, y permiten distinguir fenotipos de SAHS susceptibles de opciones terapéuticas diferentes^{3,65}. Por ejemplo, los individuos con disfunción en esta musculatura dilatadora de la vía aérea pueden responder a la estimulación del nervio hipogloso, mientras que aquellos con edemas en extremidades inferiores pueden presentar una acumulación de líquido en el área de la faringe cuando el paciente se encuentra en posición supina, facilitando el colapso de la vía aérea superior durante el sueño, de forma que se podrían beneficiar de terapias de posicionamiento, así como de estrategias basadas en diuréticos y ejercicio físico⁶⁶. Los dispositivos de avance mandibular pueden resultar especialmente útiles para individuos no obesos con SAHS leve y moderado o si se tolera bien la CPAP⁵¹.

El tratamiento farmacológico (con fármacos hipnóticos) es útil en aquellos que necesiten disminuir la respuesta ventilatoria, como es el caso de los pacientes con quimiosensibilidad aumentada o aquellos con disminución del umbral de arousal.

En pacientes con apnea central del sueño, frecuentemente asociada a la insuficiencia cardiaca congestiva, se recomienda centrarse en el tratamiento del propio fallo cardiaco. Así, entre la variedad de opciones farmacológicas para la apnea central, se priorizan aquellas que optimizan el gasto cardiaco. A pesar de ello, las evidencias actuales apuntan a que la presión positiva continua es la estrategia más efectiva, aunque a diferencia de los pacientes con SAHS, la respuesta al tratamiento no es inmediata y suele requerir varios meses¹.

Por ello, dada la elevada prevalencia de apnea obstructiva del sueño sintomática en la población general, sus consecuencias y el hecho que sea fácilmente tratable, es imprescindible que los médicos (en particular los de atención primaria) se responsabilicen de identificar pacientes en riesgo y los deriven a consultas especializadas para su evaluación¹². Como se ha

comentado, la principal característica clínica para el cribado de individuos con enfermedad respiratoria del sueño es la combinación de ronquido habitual, jadeos nocturnos, episodios evidenciados de apnea y somnolencia diurna.

2.2. RIESGO CARDIOVASCULAR Y SÍNDROME DE APNEAS DEL SUEÑO

El sueño normal ofrece al organismo un periodo de tiempo de bajo estrés fisiológico, muy provechoso para el sistema cardiovascular¹. Como ya se ha comentado, los eventos obstructivos de la vía aérea superior durante el sueño inducen la activación de una serie de mecanismos que contribuyen al desarrollo de enfermedades cardiacas, vasculares, metabólicas y neurológicas. La apnea del sueño es una patología respiratoria bastante prevalente en la población, y todavía más en individuos con enfermedad cardiovascular²⁷.

2.2.1. Apnea obstructiva del sueño y sus consecuencias

La fragmentación del sueño y la hipoxia intermitente son los principales desencadenantes de las complicaciones fisiopatológicas que se observan en los pacientes con SAHS. Estas complicaciones incluyen la somnolencia diurna excesiva, las comorbilidades cardiovasculares y un incremento en la mortalidad por cualquier causa^{2,67}.

Las comorbilidades cardiovasculares y metabólicas están presentes en casi un 50% de pacientes con SAHS⁶⁸. De esta manera, se ha visto que el SAHS es la principal causa de hipertensión secundaria resistente a fármacos, además de observarse frecuentemente en pacientes con diabetes mellitus tipo 1 y tipo 2^{69,70}.

Así pues, se podría proponer que las consecuencias inmediatas de la apnea obstructiva del sueño son la disfunción metabólica, la desregulación autónoma (alteración de la actividad del sistema nervioso autónomo y del tono vagal), la disfunción endotelial y un aumento del estado inflamatorio y el estrés oxidativo⁴. Estos efectos inmediatos, a largo plazo podrían conducir al desarrollo de trastornos metabólicos, cardio- y cerebrovasculares y disfunción cognitiva⁶⁰. En definitiva, mayor morbilidad y mortalidad.

Por otra parte, desde hace años se ha estado estudiando la relación entre la hipoxia tisular observada en los pacientes con SAHS y el desarrollo de cáncer, aunque hay pocos estudios poblacionales en humanos^{71,72}. Los principales mecanismos que podrían explicar tal relación serían el estrés oxidativo, el mayor grado de inflamación sistémica (normalmente junto con obesidad) y, probablemente el más relevante, la hipoxemia intermitente^{73,74}. En estos mecanismos moleculares, podrían jugar un papel relevante la síntesis y liberación del factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1, *hypoxia-induced factor-1*), el cual presenta acciones implicadas en la producción de moléculas angiogénicas como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, *vascular endothelial growth factor*).

Aunque sea difícil atribuir ciertas complicaciones (comorbilidades) a la apnea del sueño, para estudiar la causalidad se han hecho esfuerzos con base en tres estrategias diferentes: estudios mecanísticos en animales, estudios epidemiológicos en humanos en poblaciones de gran tamaño y estudios en humanos con intervención (ensayos clínicos aleatorizados)²⁴. Por ejemplo, un análisis longitudinal demostró un riesgo tres veces mayor de desarrollar hipertensión a los 4 años en pacientes con SAHS moderado que en controles apareados⁷⁵.

Primeramente, se ha descrito que la alteración de la respiración conduce a un estado de hipoxemia intermitente e hipercapnia. Este estrés hipoxémico y su consiguiente reoxigenación llevan a un estado de hipoxia tisular que induce la producción de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno, así como a un estado de inflamación sistémica⁷⁶, que puede cronificarse.

Los mecanismos fisiopatológicos de la apnea del sueño y su relación con la enfermedad cardiovascular no son del todo conocidos, por una parte, por la diversidad de fenotipos de la enfermedad y, por otra, por la frecuente presencia de comorbilidades que acompañan a la apnea del sueño y que afectan a la salud cardiovascular, como la obesidad⁷⁷.

Por su parte, los eventos apneicos junto con los arousals y la consiguiente fragmentación del sueño (incluso posible privación), pueden activar multitud de mecanismos implicados en la disfunción endotelial y la consiguiente enfermedad cardiovascular. A continuación, se detallan algunos de los mecanismos fisiopatogénicos clave que se cree que están activados en SAHS y podrían potenciar la disfunción cardiovascular.

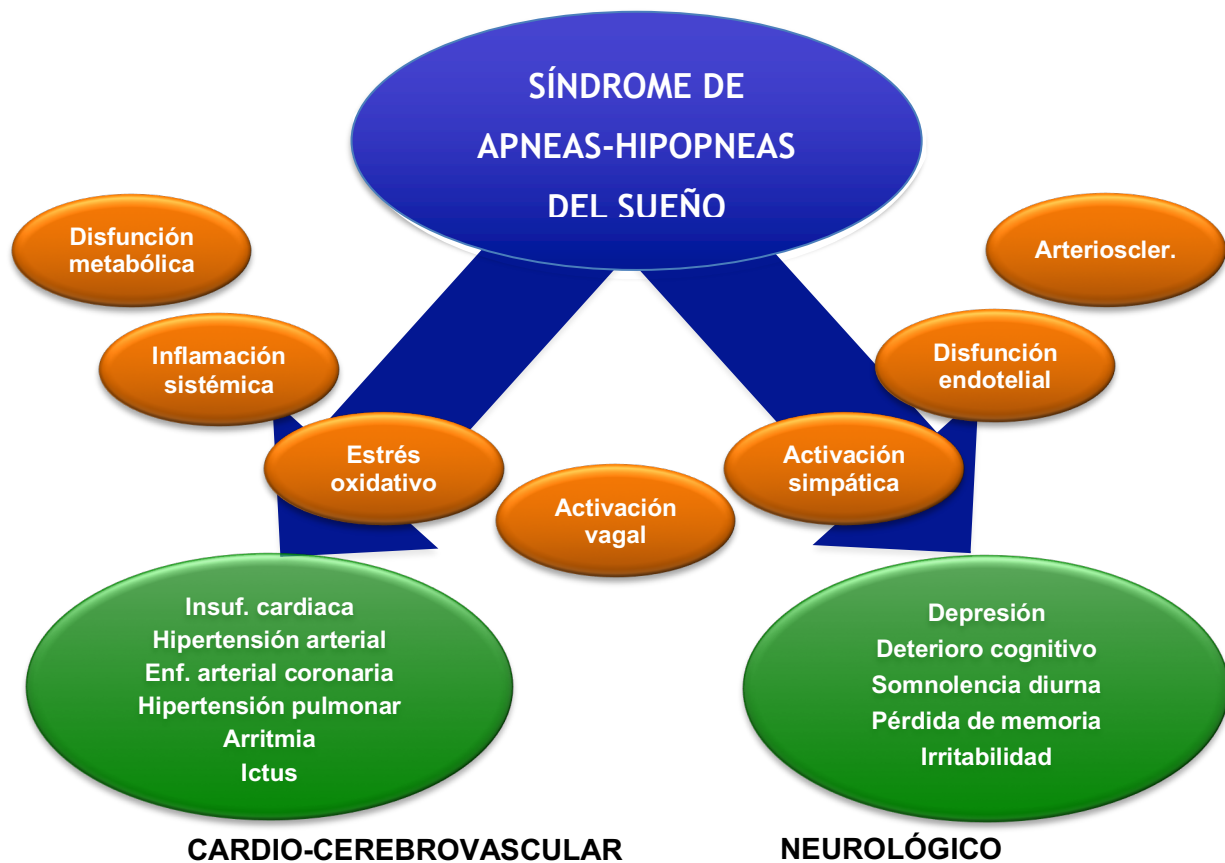


Figura 5. Mecanismos fisiopatológicos y complicaciones del SAHS

2.2.2. Fisiopatología de la enfermedad cardiovascular en SAHS

2.2.2.1. Activación simpática

El sistema nervioso simpático se encarga de la inervación de los músculos lisos, el miocardio y las glándulas de todo el organismo. Además de mantener la homeostasis, su función primordial es la de estimular la respuesta de 'defensa o huida'. En individuos sanos, hay una disminución de la actividad del sistema nervioso simpático durante el sueño, mientras que se aumenta la actividad del parasimpático.

En pacientes con SAHS, durante la fase REM, ocurre un aumento de la actividad simpática que, además, se ha visto también en estos pacientes cuando están despiertos², incluso en ausencia de comorbilidades. Los quimiorreceptores centrales y periféricos responden a la

hipoxemia y a la hipercapnia incrementando el tono simpático, de forma que aumentan la frecuencia cardiaca y la presión arterial⁷⁷. La hipoxemia parece ser un estímulo más potente que la hipercapnia para la excitación simpática. La hiperventilación induciría un efecto feedback inhibitorio, y cuando ocurre un evento apneico, la excitación simpática no encuentra oposición por hiperventilación⁷⁷.

Cuando tiene lugar un evento de obstrucción de la vía aérea, se activa el tono simpático y el esfuerzo respiratorio asociado provoca un incremento en la presión intratorácica negativa. Así, la activación del sistema nervioso simpático frente al parasimpático causa un incremento en la frecuencia cardiaca y en la presión arterial^{77,78}. Los arousals consiguientes permiten acabar con la situación de asfixia y reoxigenar rápidamente, lo que todavía aumenta más el tono simpático.

Se ha visto que un aumento de la actividad simpática también favorece la liberación de renina por parte del riñón, lo que se traduciría en niveles incrementados de angiotensina II en sangre y una mayor presión arterial, aunque estos hallazgos están todavía en debate en los pacientes con SAHS^{79,80}.

En los individuos con apnea del sueño, otro hallazgo consistente con las alteraciones en el sistema nervioso autónomo es el aumento en la concentración circulante de catecolaminas, debido a la activación de quimiorreceptores situados en la arteria carótida, y cuyos niveles sanguíneos bajan cuando se instaura un tratamiento efectivo^{81,82}. Este aumento en la secreción de catecolaminas induce vasoconstricción arteriolar sistémica⁶⁰.

2.2.2.2. Estrés oxidativo

El estado de estrés oxidativo se debe a una alteración del balance prooxidante/antioxidante y, en esta patología respiratoria, suele deberse a una falta en la biodisponibilidad del oxígeno molecular durante los eventos apneicos, así como a la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS, *reactive oxygen species*) durante la reoxigenación⁸³.

Las relaciones del estrés oxidativo con las complicaciones del SAHS son complejas. Por una parte, se ha visto que contribuye al desarrollo de dislipemia y de intolerancia a la insulina, esto es, favorece el síndrome metabólico y la obesidad⁸⁴. Incluso, debido al aumento de los niveles de ROS, se han encontrado mayores concentraciones circulantes de biomarcadores relacionados con la peroxidación lipídica u oxidación proteica en pacientes con SAHS, los cuales pueden ser parcialmente normalizados cuando se aplica tratamiento efectivo con CPAP. Por otra parte, los niveles de antioxidantes suelen estar disminuidos en pacientes con SAHS y aumentan con CPAP⁸⁵.

Como consecuencia de la presencia de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno, el estrés oxidativo lleva a un estado de inflamación sistémica y activación simpática, los cuales a su vez potencian el propio estrés oxidativo. Y la combinación de estos tres mecanismos (estrés oxidativo, activación simpática e inflamación) es lo que probablemente conduce a disfunción endotelial, hipertensión y aterosclerosis^{2,86}.

Gran parte de los estudios que han valorado la relación entre el estrés oxidativo y la apnea del sueño han investigado la sobrerregulación y sobreexpresión de genes sensibles al estado redox, así como aquellos implicados en la cascada de respuesta inflamatoria. La principal vía de señalización analizada es aquella en la que está implicado el factor nuclear κ B (NF κ B)¹: la rápida reoxigenación que se observa al final de una apnea o hipopnea conduce a la producción de radicales libres, que incrementan la expresión de NF κ B.

Las células endoteliales son particularmente susceptibles al estrés oxidativo, dado que las ROS disminuyen la producción de óxido nítrico e incluso pueden inactivar el biodisponible, con lo que se reduciría el efecto protector de este gas vasodilatador derivado del propio endotelio^{24,87}.

2.2.2.3. Inflamación sistémica

La inflamación es una respuesta fisiológica compleja del organismo a estímulos externos dañinos, cuya principal finalidad es eliminar la causa inicial del daño, eliminar las células o tejidos propios dañados e iniciar la reparación. En esta respuesta biológica intervienen multitud de componentes, desde elementos celulares, citoquinas y quimioquinas, aminas vasoactivas, factores de crecimiento e incluso lípidos.

El SAHS se ha relacionado con niveles incrementados de citoquinas proinflamatorias⁷⁷, y una explicación plausible es que la hipoxia tisular es un potente desencadenante de las respuestas proinflamatoria y adaptativa, dado que es interpretada como lesión al organismo.

De forma paralela a la inflamación tisular, el término inflamación sistémica no está confinado a un determinado tipo celular o localización específica, sino que engloba también el resto de sistemas del organismo, incluyendo el endotelio vascular. Los leucocitos de los individuos con apnea del sueño presentan un fenotipo proinflamatorio y protrombótico², lo que podría facilitar la disfunción endotelial, aterosclerosis y trombosis⁸⁸. Este fenómeno se ha descrito debido a:

- Mayor activación de leucocitos y plaquetas⁸⁹.
- Mayor producción de ROS y moléculas de adhesión en monocitos.
- Mayor vida media y mayor expresión de moléculas de adhesión de los neutrófilos.
- Mayor producción de citoquinas proinflamatorias (TNF α) en linfocitos T CD8⁺.
- Mayor adherencia y citotoxicidad de los linfocitos GD, así como mayor producción de citoquinas proinflamatorias como (TNF α , IL-8) y menor producción de antiinflamatorias (IL-10)⁹⁰.

La hipoxia intermitente también activa la expresión de genes regulados por el factor de transcripción NF- κ B (vía proinflamatoria), creando así una atmósfera proinflamatoria y consecuentemente induciendo aterosclerosis. Como resultado, se observan niveles incrementados de citoquinas proinflamatorias como IL-6, IL-8, TNF α y también de proteína C-reactiva (PCR)^{91,92}.

2.2.2.4. Función vascular/endotelial

El endotelio vascular juega un papel fundamental en la homeostasis vascular, dado que regula la vasoconstricción, vasodilatación, coagulación intravascular y la inflamación². Debido a una reducción en la actividad de la óxido nítrico sintasa (NOS), los pacientes con apnea del sueño tendrían niveles reducidos de óxido nítrico (NO), un potente vasodilatador. Además, se asume que la capacidad de reparación celular estaría alterada en estos pacientes, y se hallaría un aumento de la apoptosis.

El NO es un vasodilatador producido por las células endoteliales, y está implicado en funciones antiinflamatorias, antioxidantes y antitrombóticas. La reducción en la biodisponibilidad de NO favorece la expresión de endotelina, un potente vasoconstrictor, así como de su receptor.

Se ha visto que las alteraciones en la función endotelial son frecuentes en individuos con SAHS⁹³ y, si va acompañado de síndrome metabólico, se suele hallar un incremento significativo del riesgo de complicaciones cardiovasculares, debido a una sinergia entre ambas condiciones.

Así, los pacientes con apnea del sueño presentan una mayor disfunción endotelial que los individuos sanos. De hecho, se ha propuesto que el grado de hipoxemia podría predecir el grado de disfunción endotelial en los pacientes con SAHS⁹⁴. Además, en estudios no randomizados, se ha descrito que la terapia con CPAP podría mejorar este fenómeno⁹⁵.

2.2.2.5. Disfunción metabólica

Como ya se ha comentado, una mayor actividad simpática está asociada a alteraciones en la homeostasis de la glucosa y la insulina en individuos con SAHS⁹⁶. Por ejemplo, la hipoxia intermitente reduce la captación de glucosa por parte del músculo esquelético y, mediante el estrés oxidativo, incrementa la proliferación y muerte de las células β -pancreáticas.

En relación al metabolismo lipídico, la hipoxia intermitente se ha asociado a un aumento en los niveles de colesterol sérico, de fosfolípidos, a un incremento en la biosíntesis lipídica, inhibición de la captación de triglicéridos en el hígado y reducción de la actividad de la lipoprotein lipasa⁹⁷.

Dada la estrecha relación entre obesidad y SAHS, no puede establecerse claramente una causalidad, sino que los mecanismos fisiopatológicos podrían actuar de forma bidireccional, potenciándose recíprocamente. De manera similar, se ha observado una relación independiente entre SAHS y el síndrome metabólico y la resistencia a insulina. Tres ensayos clínicos aleatorizados han demostrado que el tratamiento con CPAP de los pacientes con SAHS mejora la sensibilidad a esta hormona.

Esta desregulación metabólica que se observa en los pacientes con SAHS (reflejada tanto en el metabolismo de los glúcidos como de los lípidos) podría contribuir al proceso aterosclerótico a través del daño endotelial y del endurecimiento arterial.

De todas formas, es especialmente difícil establecer una buena correlación entre los mecanismos metabólicos e inflamatorios en los pacientes con SAHS, por la fuerte asociación que existe con la obesidad⁷⁷. De hecho, los estudios observacionales han arrojado resultados conflictivos en referencia al SAHS como factor independiente de riesgo de desarrollar resistencia a la insulina.

En un ensayo clínico aleatorizado en individuos obesos con SAHS se demostró que tanto la pérdida de peso (monoterapia) como la terapia combinada de pérdida de peso y CPAP reducían los niveles de PCR, triglicéridos y la resistencia a la insulina, pero no el tratamiento individual con CPAP⁹⁸. Así, actualmente no se dispone de evidencia suficiente para describir un papel causal del SAHS en el desarrollo de la resistencia a la insulina o la dislipemia en humanos.

2.2.2.6. Arteriosclerosis

La arteriosclerosis consiste en el endurecimiento de las arterias de gran calibre debido a la deposición de colágeno y acumulación de lípidos y células, que generalmente conduce a estenosis. Este fenómeno involucra diferentes mecanismos predisponentes: el estrés oxidativo, la inflamación vascular y el incremento de la actividad simpática². Se han descrito asociaciones entre la apnea del sueño y algunos índices relacionados con el endurecimiento arterial^{99,100}.

2.2.3. Complicaciones cardiovasculares de la apnea del sueño



Figura 6. Adaptada de Javaheri *et al.* (*J Am Coll Cardiol* 2017)¹. Factores etiológicos de la apnea del sueño y su relación con la patogenia de la enfermedad cardiovascular terminal.

Como ya se ha comentado en el apartado anterior, la apnea del sueño moderada y grave está asociada con una mayor incidencia de enfermedad cardiovascular; incluyendo hipertensión arterial, hipertensión pulmonar, insuficiencia cardiaca, enfermedad arterial coronaria y fibrilación auricular^{6,77,101,102}, aunque los mecanismos fisiopatogénicos no están del todo claros todavía⁶⁸. Según la revisión publicada por Javaheri y colaboradores¹, la prevalencia de SAHS en pacientes con hipertensión es 30-83%, en pacientes con enfermedad coronaria de 38-65%, en pacientes con ictus del 57-75%, en pacientes con insuficiencia cardiaca del 12-55% y en pacientes con arritmias del 20-50%.

A continuación se exponen algunos mecanismos que podrían ayudar a entender las conexiones que existen entre el SAHS y la patología cardiovascular:

2.2.3.1. Hipertensión arterial

Se estima que la prevalencia de hipertensión en los individuos con SAHS varía entre 35-80%⁴⁷ y, a su vez, un 40% de pacientes con hipertensión acaban siendo diagnosticados con SAHS. De hecho, la apnea del sueño está considerado uno de los principales factores de riesgo de hipertensión secundaria. La hipertensión, en estos pacientes, se debe a la activación del sistema nervioso simpático durante los episodios repetidos de apnea-hipopnea, con su consecuente vasoconstricción, tanto a nivel agudo como crónico.

Otros mecanismos que podrían relacionar el aumento en la presión arterial con la apnea del sueño, además de la sobreactivación del sistema nervioso simpático, son: el estrés oxidativo, la desregulación metabólica y las alteraciones neurohormonales⁷⁷ (leptina, insulina...).

En el Wisconsin Cohort Sleep Study, la apnea del sueño demostró ser un factor de riesgo independiente de hipertensión sistémica, y el riesgo incrementaba proporcionalmente con el IAH¹⁰³. Otro estudio observacional también confirmó un aumento en la hipertensión en individuos con SAHS sin tratar comparados con controles sin SAHS; y la terapia con CPAP disminuía el riesgo de forma dosis-dependiente¹⁰⁴, aunque estos resultados no se confirmaron en la Vitoria Sleep Cohort¹⁰⁵.

A pesar de los resultados dispares de estos estudios poblacionales, la mayor evidencia del efecto causal del SAHS sobre el aumento de la presión arterial proviene de los ensayos clínicos aleatorizados, en los que ha habido intervención⁷⁷. La mayoría de ellos han informado de una reducción significativa en la presión arterial de los individuos gracias a la terapia con CPAP, aunque la magnitud del efecto era pequeña^{106,107}.

2.2.3.2. Insuficiencia cardiaca

La prevalencia real de insuficiencia cardiaca entre los individuos con apnea del sueño no se conoce por la variabilidad de valores que ofrecen los diferentes estudios⁶⁰. Por ejemplo, dos estudios independientes evaluaron pacientes diagnosticados de insuficiencia cardiaca en busca de criterios de SAHS y paralelamente, encontraron que un 37%¹⁰⁸ y un 11%¹⁰⁹ cumplían los criterios; unos porcentajes considerablemente diferentes.

El mecanismo más probable por el cual el SAHS induce el desarrollo de disfunción ventricular izquierda es a través de la elevación de la presión arterial¹¹⁰. También podrían contribuir a ello la producción de citoquinas, catecolaminas, endotelina y otros mediadores que se ven incrementados en los individuos con SAHS, independientemente de la hipertensión.

2.2.3.3. Enfermedad coronaria isquémica

La cardiopatía isquémica es un conjunto de alteraciones debidas a un desequilibrio entre el aporte de sangre por las arterias coronarias y el requerimiento de oxígeno del miocardio, generalmente debida a arteriosclerosis.

Las alteraciones de la respiración durante el sueño parecen ser el doble de frecuentes entre los individuos con enfermedad coronaria que entre aquellos que no presentan¹¹⁰. Como se verá más adelante, varios factores presentes en los individuos con SAHS podrían predisponer al desarrollo de la isquemia, como la hipoxemia intermitente, el incremento de la tensión arterial,

la vasoconstricción por activación simpática y los cambios en las presiones intratorácica y transmural⁶⁰.

2.2.3.4. Arritmias

Las arritmias son faltas de regularidad o alteraciones de la frecuencia o ritmo de los latidos del corazón. Están presentes en casi la mitad de individuos con SAHS, y son más frecuentes a medida que aumenta su gravedad¹¹⁰. Con apneas más prolongadas y mayor desaturación de oxígeno tiene lugar un incremento más pronunciado del tono vagal, debido a la estimulación frecuente del sistema nervioso simpático¹¹¹.

2.2.3.5. Ictus y accidente isquémico transitorio

El ictus o accidente cerebrovascular se produce cuando no llega suficiente irrigación sanguínea a algún área del cerebro y, según su etiología, puede ser de tipo isquémico (embólico o trombótico) o hemorrágico (derrame). Se ha visto que el SAHS es muy común en los pacientes con ictus, viéndose que hasta un 72% de pacientes que habían sufrido un ictus presentaban un IAH superior a 5 h⁻¹ ¹¹².

A su vez, el SAHS también es un factor de riesgo independiente de ictus^{67,77}. En un estudio observacional con una cohorte de tamaño considerable, el SAHS se asoció con una mayor incidencia de ictus y de muerte por cualquier causa, de forma dosis-dependiente, y esta relación se cumplía incluso para fenotipos leves⁶⁷.

La observación de que los accidentes isquémicos cerebrales en los pacientes con SAHS ocurrían más frecuentemente por la noche, llevó a pensar que los propios eventos apneicos agudos podían jugar un papel directo y desencadenante de ictus en estos pacientes¹¹³. Por otra parte, varios estudios han demostrado que la terapia con CPAP mejoraba el pronóstico de los pacientes tras el ictus⁷⁷.

2.2.3.6. Mortalidad

El principal *endpoint* que se utiliza para la mayoría de estudios clínicos tanto de SAHS como de cualquier otra patología es la mortalidad. A través de los diferentes mecanismos fisiopatológicos, el SAHS está relacionado con una mayor morbilidad y mortalidad¹. Además de las consecuencias cardiovasculares, de acuerdo con una revisión de Malhotra y colaboradores¹⁴, los individuos con SAHS tienen 7 veces más probabilidades de sufrir accidentes de tráfico y 2,2 veces más accidentes laborales que aquellos individuos sin SAHS, lo que se podría asociar a una pérdida considerable de años de vida potencial. De hecho, Phillipson en 1993 ya escribió que, entre todas las patologías relacionadas con el sueño, el SAHS es la más seria en términos de morbilidad y mortalidad¹².

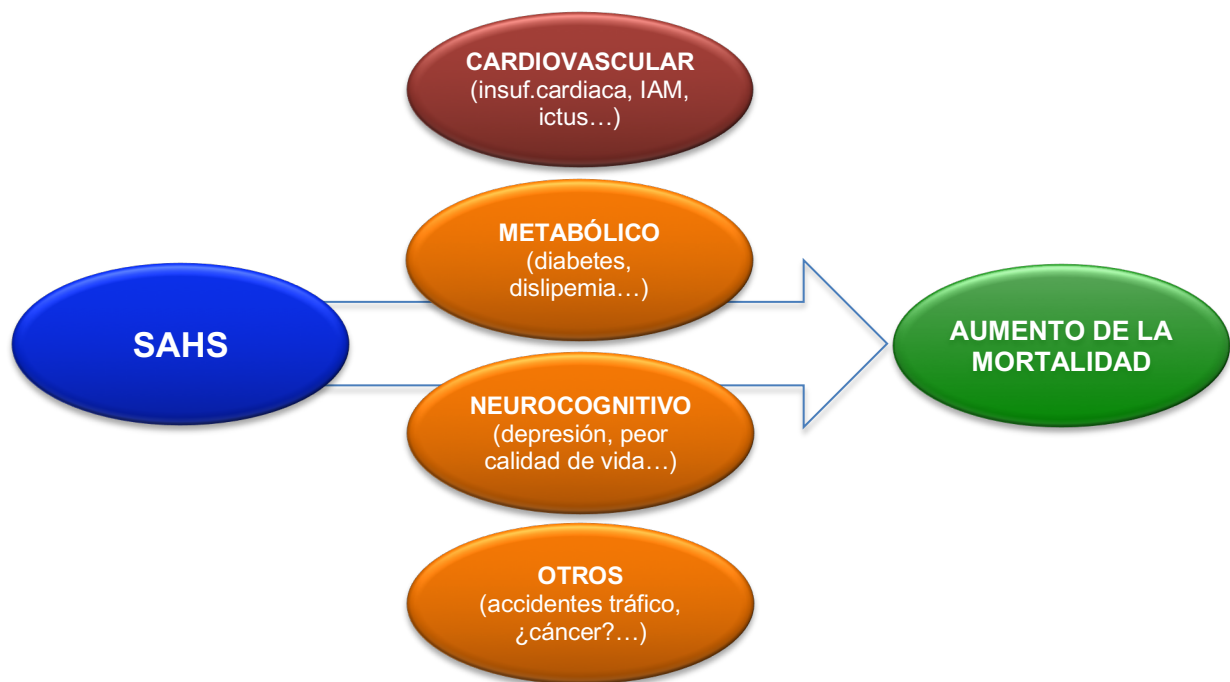


Figura 7. Adaptada de Drager *et al.* (*Circulation* 2017).
Mecanismos relacionados con el aumento de mortalidad debido al SAHS.

El SAHS es responsable de una mayor tasa de reingresos hospitalarios¹⁵. Los principales mecanismos a través de los cuales se ha asociado el SAHS con una mayor tasa de mortalidad prematura son aquellos relacionados con la patología cardiovascular, como la insuficiencia cardiaca, el infarto agudo de miocardio fatal o el accidente cerebrovascular fatal¹⁶. Incluso en

algunos estudios de cohortes, se ha descrito que la asociación entre SAHS y mortalidad podría ser independiente de la obesidad¹¹⁷.

Además, se ha planteado que el tratamiento del SAHS con CPAP, además de mejorar la calidad de vida y las comorbilidades, también podría reducir la mortalidad², especialmente por causas cardiovasculares^{118,119}. Por ejemplo, en una cohorte de pacientes con insuficiencia cardíaca, se descubrió que el cribado y tratamiento del SAHS (si procedía) mejoraba considerablemente la mortalidad frente a aquellos en los que directamente no se estudiaba¹²⁰. Por todo ello, se están realizando actualmente varios ensayos clínicos aleatorizados y así poder valorar la utilidad del tratamiento con CPAP en la prevención secundaria de eventos cardiovasculares.

2.3. EL SÍNDROME CORONARIO AGUDO

El síndrome coronario agudo es una de las principales causas de muerte y discapacidad en todo el mundo. En Estados Unidos, a pesar de que la incidencia de muertes por infarto de miocardio va disminuyendo, siguen contabilizándose unos 550.000 nuevos casos anuales, y 200.000 episodios recurrentes⁸. Al ser la primera manifestación de enfermedad coronaria, suele utilizarse como indicador de uno de los principales problemas sanitarios en todos los países, y es una de las principales variables incluidas en multitud de ensayos clínicos y estudios observacionales.

2.3.1. Definición y clasificaciones

El término síndrome coronario agudo hace referencia a un conjunto muy diverso de eventos que conduce a la falta de oxígeno del músculo cardiaco (isquemia miocárdica) y al consecuente daño cardiaco¹²¹. Cuando se habla de infarto agudo de miocardio (IAM), deben distinguirse 3 condiciones diferentes en función de las características del segmento ST del electrocardiograma (ECG):

- Infarto de miocardio con elevación del segmento ST (STEMI, *ST-elevation myocardial infarction*), en el que se observa una obstrucción completa de la arteria coronaria y necrosis miocárdica.
- Infarto de miocardio sin elevación del segmento ST (NSTEMI, *non-ST-elevation myocardial infarction*), en el que se observa una obstrucción parcial de la arteria coronaria y necrosis miocárdica.
- Angina inestable, en la que hay una obstrucción parcial de la arteria y todavía no ha ocurrido la necrosis del miocardio.

Atendiendo a la causa desencadenante, el infarto puede subclasificarse en 6 tipos¹²²: infarto espontáneo debido a aterotrombosis coronaria (tipo 1), debido a un desequilibrio entre aporte

y demanda no debido a aterotrombosis (tipo 2), muerte cardiaca (sin oportunidad de realizar ECG o cuantificar biomarcadores) (tipo 3), infarto relacionado con una intervención coronaria percutánea (tipo 4a), infarto debido a la trombosis de un *stent* coronario (tipo 4b) e infarto debido a la colocación de un bypass coronario-arterial (tipo 5).

De acuerdo con la tercera definición universal del infarto agudo de miocardio¹²³, del año 2012, este término debería utilizarse únicamente cuando exista evidencia de necrosis miocárdica consistente con isquemia.

Cuando se valoran las diferencias por géneros, varios estudios han demostrado que las mujeres que presentan un síndrome coronario agudo suelen ser mayores y con mayor presencia de comorbilidades (diabetes, hipertensión, insuficiencia cardiaca congestiva...) que los hombres¹²⁴. De hecho, entre los mecanismos que desencadenan el infarto las mujeres suelen presentar frecuentemente disección espontánea de la arteria coronaria o vasoespasmos, a diferencia de la rotura de la placa de ateroma vista típicamente en los hombres.

Los principales factores de riesgo para el infarto agudo de miocardio son edad, género, perfil lipídico, tensión arterial, diabetes mellitus, hábito tabáquico y etnia¹²². Según Berry y colaboradores¹²⁵, el riesgo de padecer IAM es <5% en ausencia de factores de riesgo, mientras que la alteración de 2 o más de ellos incrementa la posibilidad de padecer un IAM hasta el 50% en hombres y el 31% en mujeres.

Junto con los factores de riesgo comunes, las mujeres presentan además factores de riesgo específicos como la menopausia o la terapia anticonceptiva oral (asociada a las altas dosis de estrógenos).

2.3.2. Fisiopatología y diagnóstico del infarto agudo de miocardio

El infarto de miocardio se debe a la muerte de las células del músculo cardíaco (miocardiocitos) debido a una isquemia prolongada¹²³. El contenido intracelular de estas células puede ser vertido al torrente circulatorio, de forma que el daño miocárdico se puede detectar fácilmente mediante la cuantificación de moléculas (biomarcadores) específicos, como pueden ser la fracción MB de la creatina kinasa o las troponinas T e I. Estas últimas son componentes del mecanismo de contracción de los miocardiocitos y están actualmente considerados los mejores biomarcadores para el estudio del daño miocárdico, debido a su elevada especificidad tisular y sensibilidad diagnóstica¹²⁶. Además de la necrosis que ocurre durante el IAM, hay otras múltiples situaciones clínicas que están asociadas a daño miocárdico no isquémico, normalmente con extensiones necróticas mucho más limitadas. Estas situaciones incluyen la insuficiencia cardíaca o renal, miocarditis, arritmias, shock séptico, hemorragia intracerebral y tromboembolismo pulmonar, entre otros.

Asimismo, la liberación de las isoformas cardiospecíficas de troponina es posible, no solo debido al infarto, sino también a otros mecanismos fisiológicos, como puede ser el recambio normal de los miocardiocitos, la apoptosis o el aumento de la permeabilidad de la membrana celular¹²⁷.

Las condiciones que permiten establecer un diagnóstico de IAM están basadas en la detección de un incremento y/o disminución en la concentración plasmática de biomarcadores cardíacos (por ejemplo, la troponina T o I), siempre con algún valor por encima del percentil 99 de la población de referencia, junto con una elevada probabilidad pre-test, que puede ser reflejada mediante síntomas de isquemia, hallazgo de ondas Q patológicas en el ECG, estudios de imagen compatibles o bien la detección de un trombo intracoronario mediante angiografía o autopsia^{128,129}. Los síntomas de isquemia son inespecíficos y los pacientes suelen presentar combinaciones de dolor torácico, malestar de las extremidades superiores, dolor mandibular o epigástrico, así como disnea o fatiga, y suelen ir acompañados de diaforesis, náuseas o síncope.

No obstante, la presentación de los síntomas es diferente entre mujeres y hombres. Las primeras suelen presentar más frecuentemente síntomas atípicos (p.ej. náuseas, molestias en la parte superior de la espalda, cuello y mandíbula), y al contrario menor dolor torácico que en el género masculino¹³⁰.

La determinación seriada de troponina en muestras de sangre periférica es el método de elección para la distinción entre infarto de miocardio de otras entidades como la angina inestable. La aparición de nuevos ensayos altamente sensibles de troponina (*hsTn*, *high-sensitivity cardiac troponin I/T assays*) permitió centrarse en el estudio del patrón de cambio de los niveles plasmáticos de troponina y no solamente en el valor absoluto de concentración, aumentando así la sensibilidad y especificidad diagnósticas para el IAM y reducir el tiempo necesario para el diagnóstico hasta 1-2 horas¹²⁸. No obstante, la diferente cinética de liberación de troponina T comparado con troponina I hace que estos dos biomarcadores no sean intercambiables a la hora de hacer un seguimiento de la evolución tras el daño isquémico^{131,132}.

2.3.3. Estrategias terapéuticas

El manejo inicial de un paciente con diagnóstico de síndrome coronario agudo incluye la limitación de la actividad física (reposo en cama), con monitorización electrocardiográfica continua y la administración de terapia antitrombótica. La gravedad de los síntomas que presente el paciente y el riesgo de muerte cardiovascular van a guiar el tratamiento complementario¹²².

La farmacoterapia en el manejo inicial del IAM presenta tres vertientes¹²⁸:

- Compensación del desequilibrio entre aporte y demanda miocárdica. Comprende la administración de oxígeno (recomendada únicamente en pacientes con hipoxemia o insuficiencia respiratoria), nitratos (nitroglicerina sublingual, para aliviar las molestias de la isquemia), analgésicos (morfina, para dolor persistente), beta-bloqueantes (solo si el

paciente no presenta factores de riesgo de shock cardiogénico) o bloqueantes de los canales de calcio si los beta-bloqueantes no son efectivos o están contraindicados.

- Destrucción del trombo coronario y prevención de trombogénesis futura: mediante terapia antiplaquetar (aspirina y un inhibidor del receptor P2Y12 orales) y anticoagulante.
- Prevención de la progresión de la enfermedad: terapia con estatinas para el manejo de la dislipemia e inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (en pacientes con fracción de eyección ventricular izquierda disminuida, hipertensión, diabetes mellitus o enfermedad renal crónica estable).

Tras la intervención inicial, los objetivos terapéuticos son diferentes en función de la presencia o ausencia de elevación del segmento ST en el electrocardiograma.

- STEMI. La principal finalidad es la reperfusión urgente del miocardio en situación de isquemia. La reperfusión coronaria se consigue mediante fibrinólisis intravenosa o bien con una intervención coronaria percutánea primaria (ICP, angioplastia o colocación de un *stent*), siendo la última la estrategia más recomendada para individuos con aparición de los síntomas inferior a 12h, por presentar menores tasas de reinfarto, de hemorragia intracraneal o de muerte prematura¹³³. No obstante, si la ICP va a demorarse o el hospital no cuenta con tales instalaciones, se aconseja iniciar terapia fibrinolítica seguida de un traslado del paciente a un hospital con posibilidad de realizar ICP.
- NSTEMI. En estos casos, el paciente es dirigido bien a una terapia invasiva (la mayoría de pacientes) o bien a una terapia guiada por isquemia. La segunda suele aplicarse a personas con bajo riesgo de isquemia recurrente y a aquellos que están en hospitales sin servicios intervencionales.

2.3.4. Gravedad y pronóstico del infarto agudo de miocardio

Las complicaciones tanto a corto como a largo plazo derivadas del IAM han disminuido considerablemente en los últimos años gracias a una detección más precoz y a la mejora de las opciones terapéuticas. Sin embargo, éstas siguen siendo una de las principales causas de muerte a nivel global¹³⁴.

Además de los marcadores universales de riesgo, como la edad avanzada, diabetes, enfermedad renal y otras comorbilidades, la gravedad de un IAM depende principalmente de las características intrínsecas del evento¹³⁵, y también se ve influenciada por el tiempo entre la aparición de los síntomas y la admisión en el centro hospitalario¹³⁶.

Se pueden utilizar varios indicadores para evaluar la gravedad de un infarto agudo de miocardio. Entre ellas, destacan la presentación clínica, la clasificación Killip-Kimball, marcadores electrocardiográficos (elevaciones del segmento ST, presencia de ondas Q) y concentraciones de marcadores bioquímicos¹³⁶.

La clasificación Killip-Kimball¹³⁷, o simplemente Killip, se trata de una estratificación de la gravedad del síndrome coronario agudo en el momento del ingreso, y permite establecer un pronóstico de su evolución, relacionándolo con la probabilidad de muerte a los 30 primeros días. Esta escala hemodinámica clasifica a los pacientes en cuatro clases:

- Killip I: Pacientes sin signos ni síntomas de insuficiencia cardiaca.
- Killip II: Pacientes con estertores o crepitantes húmedos, tercer ruido cardiaco o hipertensión venosa yugular.
- Killip III: Pacientes con edema agudo de pulmón.
- Killip IV: Shock cardiogénico. Pacientes con hipotensión arterial (sistólica <90 mmHg) en ausencia de hipovolemia.

En los casos de IAM no complicados, se ha podido llegar a estancias hospitalarias de tan solo 3 días. Durante los días de ingreso se va aumentando paulatinamente la actividad física del

paciente, debidamente monitorizada, se va proporcionando educación en temas de dieta y hábitos de vida y se cambia el tratamiento farmacológico a fármacos administrados por vía oral.

Antes del alta hospitalaria se realizan los exámenes funcionales que permiten valorar el pronóstico a corto plazo del evento coronario^{122,128}. Entre ellos, destaca la ecocardiografía para la evaluación de la funcionalidad del ventrículo izquierdo y, en pacientes seleccionados, también una prueba de esfuerzo. De hecho, la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (LVEF, *left ventricular ejection fraction*) es decisiva a la hora de seleccionar la estrategia terapéutica a seguir, tal como indican las guías europeas y americanas^{128,135}.

2.3.5. Complicaciones y comorbilidades del infarto agudo de miocardio

La mayoría de las complicaciones aparecen durante los primeros días tras el infarto, incluso durante el periodo de estancia hospitalaria. Las principales comorbilidades se dividen en trastornos del ritmo cardiaco, insuficiencia mecánica y otras complicaciones.

2.3.5.1. Trastornos del ritmo cardiaco

Las arritmias cardiacas pueden ser de distinta intensidad y forma. El mayor peligro de las arritmias radica en su capacidad para provocar taquicardia, fibrilación ventricular, la fibrilación atrial o bradicardias.

2.3.5.2. Trastornos mecánicos

En función de la extensión del infarto, el miocardio puede perder su función contráctil y no bombear el volumen de sangre suficiente para las necesidades del organismo. Así, de todas las complicaciones relacionadas con el IAM, la insuficiencia cardiaca es la más frecuente y la principal causa de muerte intrahospitalaria relacionada con IAM, que puede estar presente en

el momento de la admisión o bien desarrollarse durante la estancia hospitalaria¹³⁸. Un estudio en Noruega reveló que este hecho ocurría hasta en un 17% de pacientes sin historia de insuficiencia cardíaca previa¹³⁹.

La forma más grave de presentación de la insuficiencia cardíaca después de un IAM es el shock cardiogénico, y se ha visto que la única estrategia para reducir la mortalidad de los pacientes con shock cardiogénico es una revascularización precoz.

2.3.5.3. Otras complicaciones

Aunque en menor frecuencia, como consecuencia de un infarto agudo de miocardio también puede aparecer rotura cardíaca, aneurisma ventricular, pericarditis o tromboembolismo pulmonar.

2.3.5.4. Consecuencias a largo plazo

Además de las anteriores repercusiones clínicas en los días siguientes al evento coronario, la posibilidad de recurrencia del infarto (reinfarto) es considerablemente elevada. La evolución a largo plazo de los pacientes depende principalmente de la gravedad de lesión coronaria, la capacidad funcional del ventrículo cardíaco y la presencia de arritmias graves.

Así, uno de los principales objetivos en el seguimiento de los pacientes tras un evento coronario agudo es la prevención de nuevos episodios, de forma que se deberá calcular individualmente el riesgo de recurrencia para cada paciente y establecer estrategias terapéuticas y de prevención secundaria adecuadas. Este estudio individual puede realizarse, por ejemplo, mediante una prueba de esfuerzo (ergometría) o bien mediante un cateterismo en aquellos pacientes con signos de peor pronóstico.

2.3.6. Infarto agudo de miocardio y síndrome de apneas del sueño

El SAHS es muy prevalente en individuos con arritmias, hipertensión, ictus o insuficiencia cardíaca^{140,141}. No obstante, se ha visto que existe un infradiagnóstico de este síndrome en pacientes con enfermedad cardiovascular¹⁴², y este aspecto es de alta relevancia dado que las patologías respiratorias del sueño podrían incrementar todavía más la incidencia de eventos coronarios o cerebrovasculares^{50,143,144}. El riesgo de eventos cardiovasculares podría disminuir con el tratamiento dirigido a la patología respiratoria (CPAP). Además, se cree que los pacientes con enfermedad cardiovascular y SAHS grave sin tratar tienen peor pronóstico¹¹⁹.

En un estudio con 798 pacientes de la Mayo Clinic (Minnesota, EEUU) se vio que existía una falta de conciencia y reconocimiento de SAHS durante el tratamiento del infarto agudo de miocardio¹⁴³. De acuerdo con estos resultados, se deduce que probablemente la prevalencia de SAHS en la población con IAM y, por extensión, en la población general, es significativamente mayor que la esperada.

Así, a pesar de la creciente concienciación de la sociedad en esta patología, son necesarios ensayos clínicos con un elevado número de individuos para mejorar el conocimiento de la relación entre el síndrome coronario agudo y el SAHS, así como para saber si debe incluirse el tratamiento con CPAP en las guías clínicas para pacientes tras un evento coronario para mejorar su pronóstico y reducir el riesgo de futuros episodios.

Con tal finalidad, en los últimos años se han propuesto dos grandes estudios a nivel internacional:

2.3.6.1. El ensayo clínico SAVE

El ensayo clínico SAVE (*Sleep Apnea CardioVascular Endpoints Study*) es un estudio de investigación multicéntrico, aleatorizado y controlado que empezó en 2008, y cuya finalidad es determinar los efectos del uso de la CPAP en la prevención de enfermedades cardiovasculares

(eventos cardiovascos y accidentes cerebrovasculares) en pacientes de alto riesgo con SAHS moderado-grave.

2.3.6.1.1. Metodología del estudio SAVE

Se involucraron a más de 2700 pacientes de siete países. Los participantes eran hombres o mujeres entre 45 y 75 años de cualquier etnia con antecedentes de enfermedad coronaria (infarto de miocardio, angina de pecho estable o inestable, angioplastia percutánea multivascolar, cirugía de revascularización coronaria) o cerebrovascular (ictus o accidente isquémico transitorio), y diagnosticados de SAHS moderado-grave. El punto de corte para el diagnóstico de SAHS moderado-grave fue un índice de desaturación de oxígeno ≥ 12 h⁻¹, entendido como el número de veces por hora que el registro de la oximetría mostraba disminuciones ≥ 4 puntos respecto del nivel basal.

Los participantes se dividieron aleatoriamente en las dos ramas del estudio: cuidado estándar de los factores de riesgo cardiovascular solamente, o bien CPAP y cuidado estándar. Los principales *endpoints* incluían muerte por causa cardiovascular, infarto agudo de miocardio no fatal, ictus no fatal, insuficiencia cardíaca y nuevo ingreso por angina inestable o accidente isquémico transitorio.

2.3.6.1.2. Resultados del estudio SAVE

Tal como se describe en su página web, www.savetrial.org, el estudio SAVE finalizó en diciembre de 2015 y concluyó que la terapia con CPAP no reduce el riesgo de padecer accidentes cerebrovasculares recurrentes ni ataques cardíacos en personas con enfermedad cardiovascular.

No obstante, dado que los participantes que siguieron el tratamiento cada noche durante un mínimo de 3 horas notaron mejoras significativas en su calidad de vida y su funcionamiento diario (incluyendo una reducción en sus ronquidos o la mejora del estado de ánimo), se dedujo

que la CPAP es capaz de mejorar la vida de personas con enfermedad cardiovascular con trastornos respiratorios del sueño.

2.3.6.1.3. Limitaciones y desafíos del estudio SAVE

La principal limitación del SAVE radica en la adherencia al tratamiento con CPAP, ya que el cumplimiento medio fueron solamente 3,3 h, de forma que la gran mayoría de pacientes permanecieron más de la mitad de la noche sin tratamiento.

Además, el estudio SAVE no estaba diseñado para la prevención primaria, sino a la prevención secundaria, así que no se deberían extrapolar sus conclusiones. Se hipotetiza que existe la posibilidad de que la enfermedad vascular ya presente en los individuos pueda haber minimizado el efecto positivo de la CPAP¹⁴⁵, y que los pacientes que han sobrevivido al síndrome coronario agudo ya tengan o hayan desarrollado mecanismos compensadores para ser más resistentes al daño.

Otra de las principales observaciones del estudio SAVE fue que se mejoraba la calidad de vida de los pacientes y que disminuyó el absentismo laboral relacionado con la enfermedad.

2.3.6.2. El ensayo clínico ISAACC

El ensayo clínico ISAACC (*Impact of Sleep Apnea Syndrome in the Evolution of Acute Coronary Syndrome. Effect of Intervention with Continuous Airway Pressure*) se registró en la web <https://clinicaltrials.gov> con el código NCT01335087¹⁴⁶. El investigador principal es el Dr. Ferran Barbé, del Hospital Universitari Arnau de Vilanova, IRB Lleida, e involucra a 15 hospitales de nuestro país.

Se trata de un ensayo clínico multicéntrico, controlado, aleatorizado, prospectivo, paralelo y abierto que empezó en junio de 2011.

2.3.6.2.1. Introducción a ISAACC

Se estima que la prevalencia de SAHS en pacientes con SCA es mayor que en el resto de población, pero la evaluación de enfermedades respiratorias no está contemplada en ninguna guía clínica. No obstante, las alteraciones presentes en individuos con SAHS podrían tener un efecto claramente deletéreo en la evolución de un paciente que ha sufrido un SCA, además de un peor pronóstico y mayor riesgo de mortalidad.

2.3.6.2.2. Objetivos de ISAACC

El principal objetivo de este ensayo clínico es determinar si el tratamiento con presión positiva continua (CPAP) en pacientes con SCA y SAHS reduce la tasa de eventos cardiovasculares tras un primer síndrome coronario agudo.

Los objetivos secundarios son determinar la prevalencia de SAHS en pacientes que han sufrido un evento coronario agudo, identificar biomarcadores de riesgo relacionados con las complicaciones cardiovasculares, establecer la relación entre la adherencia al tratamiento con CPAP y la incidencia de futuros eventos y realizar un estudio de coste-efectividad para el diagnóstico y tratamiento en esta cohorte.

2.3.6.2.3. Metodología de ISAACC

Este estudio reclutó pacientes que habían sido ingresados en las unidades de cuidados intensivos (UCI) de los centros participantes por haber presentado un síndrome coronario agudo. Se realizó un estudio de sueño (poligrafía) a todos los individuos, de acuerdo con las guías españolas¹⁴⁷.

Los criterios de inclusión y exclusión están detallados en un trabajo publicado en la revista *Clinical Cardiology*¹⁴⁶, y se consideró un punto de corte de IAH de 15 h⁻¹ para establecer el diagnóstico de SAHS.

Se registraron variables sociodemográficas y antropométricas de todos los participantes, así como aquellas relacionadas con la calidad de vida y el grado de somnolencia diurna.

2.4. BIOMARCADORES

2.4.1. Introducción

2.4.1.1. Definición de biomarcador

Según la definición propuesta en 1998 por el *National Institutes of Health Biomarkers Definitions Working Group*, un biomarcador o marcador biológico es “una característica que es medida y evaluada objetivamente como indicador de un proceso biológico normal, un proceso patológico o la respuesta farmacológica a una intervención terapéutica”¹⁴⁸. Por otra parte, la Organización Mundial de la Salud, en colaboración con la Organización de las Naciones Unidas y la Organización Internacional de Laboratorios lo definieron como “cualquier sustancia, estructura o proceso que puede ser medido en el cuerpo o en sus productos y que influye o predice la incidencia o resultado de una enfermedad”¹⁴⁹. Así, se deduce que los biomarcadores incluyen desde el pulso o la presión arterial hasta pequeñas moléculas cuantificadas en fluidos biológicos o tejidos¹⁵⁰.

Los signos clínicos (valoraciones objetivas del estado médico de un individuo vistos desde fuera) llevan utilizándose como biomarcadores desde hace siglos, pero los nuevos “marcadores bioquímicos” o “biomarcadores de laboratorio” no se incorporaron en la práctica clínica o la investigación hasta mitades del siglo XX, e incluso muchos están todavía en proceso de desarrollo y evaluación. Siendo un campo de investigación en crecimiento exponencial, se puede decir que actualmente los marcadores bioquímicos forman uno de los pilares esenciales de la asistencia médica en todo el mundo, y su presencia como *endpoints* de multitud de ensayos clínicos está ya totalmente aceptada¹⁵⁰.

De forma más aplicada en Bioquímica Clínica, se podría entender que un biomarcador es cualquier molécula que puede representar una función biológica y resulta útil para el cribado, diagnóstico, pronóstico, monitorización de respuesta terapéutica y la predicción del riesgo de situaciones clínicas específicas. Es una característica objetiva y cuantificable de un bioproceso,

y puede servir la detección de su presencia, la medición de su concentración, de su actividad o bien del efecto que produce sobre algún otro componente del organismo.

El biomarcador óptimo debería cumplir los siguientes criterios^{151,152}:

- Estar implicado en la principal vía fisiopatológica de la enfermedad.
- Ser accesible en términos de coste y disponibilidad.
- Ser fácilmente medible con la instrumentación disponible, de forma reproducible y fiable.
- Proporcionar nueva información de la enfermedad, o bien información añadida respecto al resto de biomarcadores conocidos.
- Mostrar un comportamiento dosis-respuesta, en relación a la extensión o gravedad de la enfermedad o a la progresión de esta con el tratamiento.
- Ser sensible para la enfermedad, lo que es especialmente relevante para posibles estrategias de cribado o de diagnóstico.
- Ser específica de la enfermedad. Que su presencia o elevación no puedan ser debidas a fenómenos fisiopatológicos distintos de la propia enfermedad.

A la práctica, un biomarcador que cumpla todos los criterios anteriormente mencionados es muy difícil de encontrar. Para su aplicabilidad en la práctica asistencial, así como en los ensayos clínicos, a un biomarcador se le exige relevancia (informatividad y utilidad) y validez (veracidad). De hecho, de Lemos y Morrow sugirieron tres criterios fundamentales para la evaluación de nuevos biomarcadores: ¿se puede medir?, ¿añade nueva información [respecto a los biomarcadores actuales]?, ¿ayuda al clínico en el manejo de los pacientes?¹⁵³.

2.4.1.2. Estructura y clasificación

Estructuralmente, la mayoría de biomarcadores utilizados en la actualidad son proteínas, péptidos o pequeños metabolitos. La mayor limitación de las estrategias basadas en DNA o RNA radica en que la gran mayoría de enfermedades no tiene una base genética sola que permita estudiarla de forma fiable y, además, la predisposición genética a una enfermedad no

es suficiente generalmente para identificar los procesos y mecanismos por los cuales esta opera¹⁵⁴.

La búsqueda y cuantificación de biomarcadores suele realizarse en fluidos biológicos, sobre todo sangre (suero o plasma), por sus claras ventajas frente al resto de fluidos¹⁵⁴, principalmente relacionadas con la facilidad de obtención de muestras y por ser el principal transportador de nutrientes, iones y otros mediadores (hormonas, neurotransmisores, enzimas...), así como de productos del metabolismo de todos los tejidos.

Por su origen, se podrían dividir los biomarcadores entre dos grupos: biomarcadores de daño y biomarcadores de función. El primer grupo de biomarcadores representa todos aquellos que se encuentran confinados en uno o unos pocos tejidos, donde realizan su función biológica. Su presencia en sangre en ausencia de lesión es despreciable, y las trazas que se encuentran responden al recambio celular o apoptosis. Cuando tiene lugar una lesión o necrosis del tejido, estas moléculas pasan al espacio intersticial y posteriormente son vertidas al torrente sanguíneo, con una velocidad que depende de su peso molecular y localización en la célula. Así, las proteínas de mayor tamaño o ancladas a la membrana tardan más en alcanzar niveles detectables en sangre que los pequeños metabolitos disueltos en el citosol. Y, para un buen biomarcador, la extensión de la lesión correlaciona con la concentración o actividad posterior del biomarcador en sangre. Como ejemplos característicos encontramos las isoformas T o I de la troponina, específicas de miocardio, que únicamente son liberadas en sangre (y en consecuencia medibles) en condiciones de daño cardíaco, la alanina aminotransferasa (ALT) como enzima presente en el citoplasma de los hepatocitos o bien la lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos (NGAL) como biomarcador de lesión tubular renal.

Los biomarcadores de función son aquellos cuya presencia en el torrente circulatorio no se debe a ninguna lesión o necrosis, sino que su concentración solamente refleja las necesidades y procesos metabólicos del organismo o de los diferentes tejidos. Siendo estructuralmente mucho más heterogéneos y más numerosos, encontramos en este grupo todos los glúcidos, lípidos, iones y hormonas, además de intermediarios metabólicos como las acilcarnitinas, cuyo aumento de concentración en sangre refleja un problema en el transporte o metabolismo

mitocondrial de los ácidos grasos, o el 21-desoxicortisol, cuya elevación indica un error en su ruta catabólica.

Se han hecho –y se están haciendo- múltiples esfuerzos para encontrar biomarcadores más precoces para el estudio de enfermedades, más baratos y fáciles de medir, más sensibles y específicos y con mayores poderes de predicción¹⁵⁵. Actualmente se dispone de biomarcadores conocidos y con gran utilidad para prácticamente todas las situaciones clínicas. De manera paralela al campo de la oncología, los biomarcadores relacionados con enfermedades cardiovasculares han ganado una enorme relevancia en el ámbito asistencial por la gran morbilidad y mortalidad de estas enfermedades, de forma que cada vez se dispone de más biomarcadores para poder entender mejor los mecanismos moleculares de estas patologías.

De acuerdo con los mecanismos fisiopatológicos implicados en el SAHS, se han estudiado múltiples biomarcadores que reflejan la complejidad de la patología. No obstante, en este trabajo se clasificarán en cuatro grupos (Figura 8):

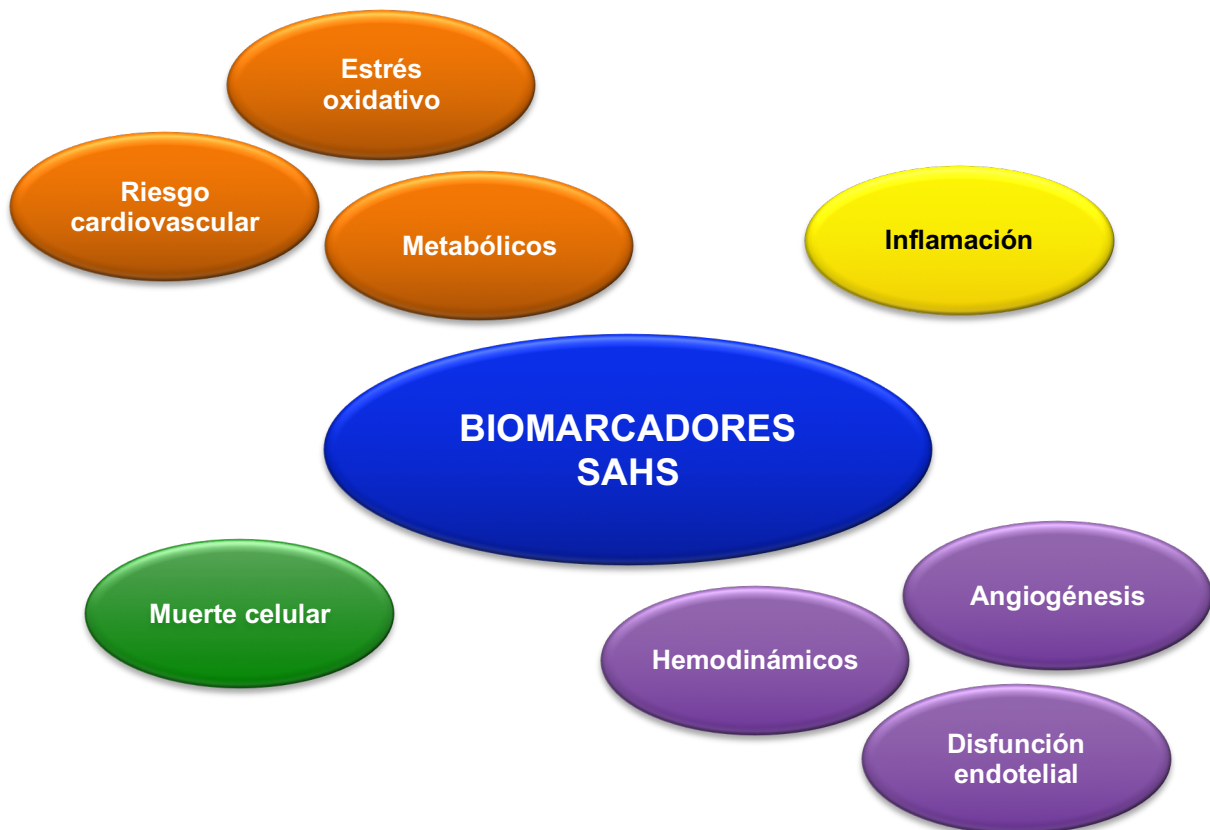


Figura 8. Clasificación de biomarcadores asociados con SAHS.

2.4.2. Biomarcadores metabólicos y de riesgo cardiovascular

Aunque la edad y el género son factores de riesgo cardiovascular muy bien conocidos y aceptados, algunos marcadores bioquímicos tienen el potencial de aumentar la estratificación del riesgo tanto en las estrategias de cribado, de diagnóstico como de pronóstico¹⁵⁶.

Las isoformas T e I de la troponina son considerados el *gold estándar* para el diagnóstico y para el seguimiento del infarto agudo de miocardio^{128,133}, pero el pilar fundamental en el caso de la enfermedad cardiovascular es la prevención y la identificación de individuos de riesgo. La escala más utilizada para este estudio es la *Framingham Risk Score*, que incluye el género, edad, colesterol total, tensión arterial, diabetes y hábito tabáquico. La detección de limitaciones de esta escala dieron pie a la aparición de otras, como la *Reynolds Risk Score*, que incluye la proteína C-reactiva en mujeres¹⁵⁷.

Los marcadores metabólicos más conocidos y utilizados de riesgo cardiovascular son el colesterol y sus diferentes fracciones, por su omnipresencia en los laboratorios clínicos alrededor del mundo y por su facilidad de análisis. Por ello, las moléculas relacionadas con el metabolismo de los lípidos también podrían ser útiles en el estudio de la enfermedad cardiovascular, incluyendo las apoproteínas que viajan en el torrente sanguíneo como parte integral de las lipoproteínas (p.ej. apolipoproteína A1, apolipoproteína B100, apolipoproteína B48...), los ácidos grasos libres, las diferentes isoformas de proteínas enlazantes de lípidos con funciones de transporte, incluso los productos resultantes del metabolismo de estos¹⁵⁸⁻¹⁶¹.

De manera paralela al metabolismo de los lípidos y como se ha detallado anteriormente, el metabolismo glucídico está directamente relacionado con el riesgo de patología cardiovascular. Por eso, la glucemia en ayunas, la concentración de insulina o la glucosilación de proteínas se podrían utilizar en los algoritmos de estratificación del riesgo. Se sabe que el SAHS, además de ser un factor independiente de riesgo cardiovascular, está relacionado con varios componentes del síndrome metabólico, particularmente la resistencia a la insulina y las alteraciones en el metabolismo lipídico^{162,163}. De hecho, existen múltiples estudios que

relacionan la intolerancia a la glucosa con la apnea obstructiva del sueño¹⁶⁴⁻¹⁶⁶. En algunos estudios se ha relacionado la resistencia a la insulina o los aumentos de glucemia basal con algunos de los síntomas del SAHS, especialmente con la somnolencia diurna¹⁶⁷, lo que puede ser útil a la hora de establecer estrategias terapéuticas^{168,169}. Además, estas alteraciones en el metabolismo de los azúcares descritas en los pacientes con SAHS los predisponen al desarrollo de diabetes mellitus tipo 2, y se ha visto que muchos pacientes con diabetes presentan también SAHS^{165,170}.

Según la revisión de De Luca Canto y colaboradores, se definió el perfil lipídico junto con la insulina como unos de los pocos biomarcadores con potencial diagnóstico para el SAHS, con una evidencia basada en estudios con limitaciones menores^{171,172}. De hecho, la falta de ensayos longitudinales y con intervención limita poder establecer una causalidad entre el SAHS y las alteraciones en el metabolismo glucídico¹⁶².

Los biomarcadores relacionados con el estrés oxidativo también juegan un papel relevante en la evaluación de la disfunción metabólica y el riesgo cardiovascular^{83,84}. La hipoxia intermitente que se produce en los individuos con SAHS está conectada directamente con un incremento en las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno¹⁷³, así como a los resultados de estas, como son la hidroxilación, oxidación y peroxidación de lípidos y proteínas, o al aumento en la síntesis y liberación de enzimas para neutralizarlas, como son la catalasa, xantina oxidasa, mieloperoxidasa o superóxido dismutasa, o incluso la gamma glutamiltransferasa, implicada en el metabolismo del glutatión^{174,175}.

Así, la cuantificación de algunas de estas enzimas podría ser útil como biomarcador indirecto del estado oxidativo (balance prooxidante/antioxidante) del organismo. De hecho, se han estudiado multitud de biomarcadores relacionados con la modificación de lípidos y proteínas en el contexto del SAHS, como los isoprostanos, resultantes de la peroxidación de ácidos grasos^{176,177}.

2.4.3. Biomarcadores de muerte celular

La muerte celular es el fenómeno por el cual una célula deja de ejercer sus funciones biológicas. Hay varios tipos de muerte celular, y de forma sencilla se podrían dividir entre la muerte celular programada, en la que las células senescentes, innecesarias o inviables son reemplazadas por otras, o bien la muerte no programada, principalmente debida a factores externos como lesión, infección, radiación, toxinas, temperaturas extremas o falta de aporte de nutrientes.

La muerte celular programada y dirigida (apoptosis o autofagia) está mediada y activada por factores intracelulares y se considera una ventaja adaptativa al medio. En este fenómeno homeostático ocurren una serie de cambios morfológicos y bioquímicos perfectamente ordenados que culminan con la degradación de proteínas y ácidos nucleicos y descomposición de la membrana plasmática para dar lugar a los cuerpos apoptóticos.

En contraposición, la necrosis supone un estado irreversible en el que tiene lugar una desnaturalización y degradación de proteínas por acción de lisosomas u otras enzimas leucocitarias, y vertido del contenido intracelular al líquido intersticial que posteriormente pasará a la sangre. Las moléculas que están confinadas en el protoplasma celular (núcleo o citoplasma), especialmente si son específicas de tejido, pueden resultar buenos biomarcadores para evaluar la lesión o daño de dicho tejido.

La cromatina se encuentra presente en el núcleo de todas las células del organismo, y está organizada mediante unidades estructurales llamadas nucleosomas que se componen por un octámero de histonas (H2A, H2B, H3, H4), rodeado y empaquetado por la doble hebra de DNA (146 pares de bases). Los nucleosomas adyacentes están conectados por la misma cadena de DNA y estabilizados mediante una histona adicional, H1.

Durante el proceso de muerte celular, especialmente la apoptosis, se activan ciertas endonucleasas que fragmentan la cromatina por los sitios más accesibles, dando lugar a estructuras de mono y oligonucleosomas¹⁷⁸. Estas estructuras, juntamente con DNA libre de

doble cadena (dsDNA) se liberan a la circulación. En condiciones fisiológicas, son eliminadas de manera eficiente mediante el sistema inmune o por metabolismo hepático, de forma que solo están presentes en pequeñas cantidades de forma circulante^{179,180}. Cuando tiene lugar una muerte celular extensa, característica de enfermedades como cáncer, inflamación aguda, infarto de miocardio o algunas patologías autoinmunes, la capacidad de eliminación de nucleosomas por el organismo no es suficiente y aparecen concentraciones aumentadas. Por ello, tanto los mono/oligonucleosomas como el DNA libre fragmentado podrían ser útiles para detectar una situación de muerte celular extensa (programada o no)^{181,182}.

Además de los estudios de asociación del dsDNA con las anteriores patologías relacionadas con la muerte celular, también se evaluó con el SAHS en un único estudio, que concluyó que sus niveles en suero estaban aumentados en estos pacientes en comparación con individuos control, tras ajustar por variables de confusión¹⁸³. Sin embargo, nunca se ha evaluado la relación entre los niveles de nucleosomas circulantes y el SAHS.

2.4.4. Biomarcadores de inflamación

La inflamación es parte de la respuesta fisiológica protectora del organismo a agentes internos o externos dañinos. La principal finalidad de la inflamación es eliminar la causa inicial de daño celular, así como de tejido propio dañado como consecuencia del proceso inflamatorio para iniciar su reparación.

La inflamación aguda consiste en la activación de la inmunidad innata que conduce a cambios hemodinámicos, alteración de la permeabilidad vascular, activación endotelial y diapédesis leucocitaria hacia el espacio intersticial y los tejidos. A nivel sistémico, se observa un cambio drástico en las concentraciones de los reactantes de fase aguda, como la proteína C-reactiva, la albúmina, el fibrinógeno, ferritina, los amiloides A y P, la antitrombina, además de un aumento de la concentración de leucocitos en sangre.

El término inflamación sistémica engloba no solamente la afectación de un determinado órgano o tejido sino también la participación del endotelio vascular. Como ya se ha detallado

anteriormente, está estrechamente relacionada con el SAHS, y el síndrome metabólico. De hecho, en los procesos de aterosclerosis y arteriosclerosis típicos de las enfermedades cardiovasculares, existe un estado de inflamación crónica de la pared arterial caracterizado por la activación de componentes celulares de células endoteliales, monocitos/macrófagos o células del músculo liso, que participan en la lesión aterosclerótica^{184,185}. Esta activación celular implica la remodelación de la matriz extracelular del subendotelio, llevada a cabo principalmente por las metaloproteasas de la matriz (MMP, *matrix metalloproteinases*), cuya actividad está regulada por inhibidores tisulares específicos (TIMP)^{186,187}. Así, la concentración o la actividad de estas enzimas podrían utilizarse para estimar el grado de síntesis/destrucción de la matriz extracelular y, por extensión, de lesión vascular e inflamación sistémica^{188,189}.

Desde un punto de vista estructural y de función biológica, se podrían describir los siguientes grupos de biomarcadores inflamatorios¹⁹⁰:

- Citoquinas y quimioquinas
- Efectores relacionados con la inmunidad
- Proteínas de fase aguda
- Prostaglandinas, ciclooxygenasas, lipoxigenasas y factores relacionados
- Factores de crecimiento y factores de transcripción.

Los biomarcadores de inflamación más instaurados en la práctica clínica son aquellos propios de la fase aguda, entre los que destacan la proteína C-reactiva y la concentración de leucocitos¹⁹¹. No obstante, existen otros biomarcadores que permiten mejorar la caracterización de este proceso, entre los que se encuentran la interleuquina 6 (IL-6) (un pirógeno secretado por células endoteliales, macrófagos, fibroblastos y linfocitos T, también relacionado con la fase aguda y con una vida media muy corta en sangre), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), moléculas de adhesión vasculares o intercelulares (VCAM e ICAM), las selectinas, la interleuquina 8 (IL-8), o la familia de más de 20 MMPs¹⁷¹, incluso el ST2 (un miembro de la familia de receptores solubles de la interleuquina 1, con valor en hemodinámica)¹⁹², o el factor de crecimiento y diferenciación-15 (GDF-15)¹⁹³.

Dado que uno de los componentes fisiopatológicos del SAHS es la inflamación sistémica, existe literatura relacionando algunos de estos biomarcadores con el diagnóstico de esta patología respiratoria del sueño^{194–196}. De hecho, un metaanálisis de 2013 que engloba 51 estudios recoge los poderes diagnósticos de 7 de estas moléculas y destaca una odds ratio superior a 2 para IL-6, ICAM y VCAM, y superior a 4 para IL-8 mientras que la PCR solamente presentó una *odds ratio* de 1,77 (IC 95% 1,28-2,26) para el diagnóstico de SAHS¹⁹⁷.

2.4.5. Biomarcadores hemodinámicos y relacionados con angiogénesis

Los péptidos natriuréticos se producen en los cardiomiocitos como respuesta a un aumento de la tensión de la pared. Reciben su nombre porque reducen la reabsorción renal de sodio (aumentan la natriuresis), disminuyendo así la volemia y el gasto cardiaco¹⁹³. A través de su acción a nivel renal, suprarrenal, vascular, cardiaco y del tejido adiposo, el resultado de su acción es la disminución de la resistencia vascular, de la presión venosa central y la consiguiente modificación de la tensión arterial sistólica^{198,199}.

El péptido natriurético cerebral (BNP, *brain natriuretic peptide*) y su propéptido sin actividad biológica pero mayor vida media en sangre, el proBNP, son sintetizados y excretados por el ventrículo y surgieron hace unos años como unos de los mejores indicadores de la función sistólica y de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo²⁰⁰. Por ello, y con un elevado valor predictivo negativo, son útiles en el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de la insuficiencia cardiaca, y tienen una creciente demanda en la práctica asistencial^{201–203}. No obstante, es fundamental tener en cuenta las variables antropométricas en la interpretación clínica de las concentraciones analíticas de BNP y proBNP, ya que sus concentraciones disminuyen con el IMC, y aumentan con la edad^{200,204}.

Otro biomarcador hemodinámico relacionado con la disfunción del ventrículo izquierdo y secretado en respuesta a estrés endógeno es la región carboxi-terminal de la provasopresina, llamada copeptina. Además, aumenta en situaciones de isquemia cardiaca, ictus, sepsis,

infecciones del tracto respiratorio o reflujo gastroesofágico, por lo que representa un indicador menos específico que los péptidos natriuréticos^{205,206}.

La angiogénesis es otro fenómeno fisiológico vital que consiste en la creación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos ya existentes²⁰⁷. Es especialmente esencial durante el desarrollo embrionario y el crecimiento, así como en la curación o cicatrización de heridas.

En contraposición a la formación de vasos sanguíneos *de novo* (vasculogénesis), la angiogénesis requiere la estimulación de las células endoteliales de los vasos ya existentes que sintetizarán y secretarán proteasas para degradar la matriz extracelular y permitir escaparse de las paredes del vaso “parental”, proliferar en otra zona y conectar los vasos. Esta estimulación puede ser mecánica o química, mediante mediadores como las prostaglandinas, las integrinas o, de manera más relevante, los factores de crecimiento angiogénico que incluyen el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), la histamina o los activadores de plasminógeno, entre otros.

Por ejemplo, el receptor 1 del VEGF, también llamado tirosina quinasa soluble similar a *fms* 1 (sFlt1, *soluble fms-like tyrosine kinase 1*) puede unirse y regular la actividad biológica no solamente del VEGF sino también al factor de crecimiento placentario (PlGF), de la misma familia, que deriva de las plaquetas y parece estar involucrada en el proceso angiogénico y de aterosclerosis^{208,209}. De hecho, a través de experimentos en ratones ya se propuso que el PlGF tenía tres funciones biológicas fundamentales: angiogénesis miocárdica, quimiotaxis y reclutación de macrófagos circulantes y modulación del desarrollo de vasos^{210,211}, con lo que podía representar un candidato excelente para el diseño de estrategias terapéuticas futuras²¹².

Dado que la expresión y secreción de PlGF están incrementadas en situaciones de hipoxia, este factor de crecimiento ha sido estudiado en relación con el SCA y la isquemia cardíaca, demostrando un buen valor pronóstico^{213,214}. En relación a la hipoxia que se produce en los pacientes con SAHS, y la consiguiente expresión del factor inducible por hipoxia 1alfa (HIF-1alfa), se ha visto que el VEGF sí está aumentado en pacientes con SAHS^{215,216}. No obstante,

no existen todavía estudios que relacionen directamente la concentración circulante de PIGF con el SAHS.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Los biomarcadores metabólicos, hemodinámicos, inflamatorios y de muerte celular pueden ser útiles para establecer y evaluar los mecanismos fisiopatológicos que relacionan el síndrome de apneas-hipopneas del sueño con el síndrome coronario agudo.

Para intentar comprobar esta hipótesis se han establecido los siguientes objetivos principales:

1. Evaluar si el síndrome de apneas-hipopneas del sueño (SAHS) constituye una situación de riesgo cardiovascular que se traduce en un incremento en las concentraciones séricas de biomarcadores de muerte celular, y si tiene impacto en el desarrollo de un síndrome coronario agudo (SCA).
2. Evaluar la utilidad de biomarcadores metabólicos, hemodinámicos e inflamatorios en la predicción de la gravedad de un SCA, y el grado de influencia del SAHS en su poder de predicción.
3. En pacientes que han sufrido un SCA, evaluar si los biomarcadores (individuales o combinados) pueden ser útiles para detectar la presencia de SAHS.

3.1. Hipótesis del primer estudio

La presencia de apnea obstructiva del sueño afecta a la utilidad del factor de crecimiento placentario (PIGF) en la predicción de la gravedad de un SCA.

Los objetivos principales de este trabajo fueron:

- Valorar el impacto de la apnea obstructiva del sueño en los niveles circulantes de PIGF.
- Evaluar si los niveles circulantes de PIGF son útiles para predecir la gravedad de un SCA en individuos con y sin apnea obstructiva del sueño.

3.2. Hipótesis del segundo estudio

La presencia de apnea obstructiva del sueño genera una situación de riesgo cardiovascular aumentado, lo que se traduce en mayores concentraciones circulantes de biomarcadores relacionados con la muerte celular. Cuando tiene lugar un SCA, la lisis celular extensiva induce concentraciones marcadamente superiores de nucleosomas y DNA de doble cadena (dsDNA).

Los objetivos principales de este trabajo fueron:

- Comparar las concentraciones séricas de nucleosomas y de dsDNA en pacientes con y sin SAHS.
- Comparar las concentraciones séricas de nucleosomas y de dsDNA en pacientes tras un SCA, con y sin apnea obstructiva del sueño.
- Evaluar la posible implicación de los biomarcadores de muerte celular en el desarrollo de un SCA.

3.3. Hipótesis del tercer estudio

La presencia de apnea obstructiva del sueño afecta a la capacidad de los biomarcadores relacionados con el riesgo cardiovascular para predecir la gravedad de un SCA.

Una combinación de biomarcadores y variables clínicas puede ser útil para detectar la apnea obstructiva del sueño en pacientes que han sufrido un evento coronario.

Los objetivos principales de este trabajo fueron:

- Evaluar el impacto de la apnea obstructiva del sueño en la asociación entre biomarcadores relacionados con el riesgo cardiovascular y la gravedad de un SCA.
- Evaluar la relación de estos biomarcadores individuales con apnea del sueño en pacientes tras un evento coronario.
- Comprobar si la combinación de biomarcadores y variables clínicas tiene un mayor poder de detección de apnea del sueño que los parámetros individuales.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para el estudio de la hipótesis y la consecución de los objetivos planteados, se escribieron y publicaron 3 artículos científicos en revistas internacionales con revisión a pares:

- Barcelo A, **Bauça JM**, Yañez A, Fueyo L, Gomez C, de la Peña M, *et al.* Impact of Obstructive Sleep Apnea on the Levels of Placental Growth Factor (PIGF) and Their Value for Predicting Short-Term Adverse Outcomes in Patients with Acute Coronary Syndrome. *PLoS ONE* 2016 11(3):e0147686. doi:10.1371/journal.pone.0147686.
 - Impact factor 2016: 2,81 (Q1)
 - 5-year impact factor: 3,39
 - *Eigenfaktor* normalizado: 220,55

- **Bauça JM**, Yañez A, Fueyo L, de la Peña M, Pierola J, Sánchez-de-la-Torre A, *et al.* Cell Death Biomarkers and Obstructive Sleep Apnea: Implications in the Acute Coronary Syndrome. *Sleep* 2017 1;40(5). doi: 10.1093/sleep/zsx049.
 - Impact factor 2016: 4,62 (Q1)
 - 5-year impact factor: 5.67
 - *Eigenfaktor* normalizado: 2.99

- **Bauça JM**, Barcelo A, Fueyo L, Sanchis P, Pierola J, de la Peña M, *et al.* Biomarker panel in sleep apnea patients after a coronary event [en revisión]

4.1. Primer estudio

Barcelo A, **Bauça JM**, Yañez A, Fueyo L, Gomez C, de la Peña M, *et al.* Impact of Obstructive Sleep Apnea on the Levels of Placental Growth Factor (PIGF) and Their Value for Predicting Short-Term Adverse Outcomes in Patients with Acute Coronary Syndrome. *PLoS ONE* 2016 11(3):e0147686. doi:10.1371/journal.pone.0147686.

4.1.1. Presentación del primer estudio

En los individuos reclutados en el ensayo clínico ISAACC, se cuantificaron en sangre periférica once biomarcadores diferentes relacionados con los diferentes aspectos fisiopatológicos del SAHS. Un análisis preliminar mostró que, de todos ellos, el biomarcador con mayor poder para la predicción de complicaciones del síndrome coronario agudo (SCA) fue el factor de crecimiento placentario (PIGF), de forma que se propuso la redacción de un primer artículo científico basado únicamente en ese biomarcador.

El PIGF es una proteína de la familia del factor de crecimiento endotelial (VEGF) producida en células del sistema cardiovascular y está implicada en la reparación de tejido dañado y en la angiogénesis. Su expresión a nivel cardiaco está inducida por hipoxia, de forma que su concentración en sangre aumenta significativamente durante un infarto agudo de miocardio (IAM).

Con este estudio se pretendía evaluar el impacto del SAHS en los niveles circulantes de PIGF en pacientes tras un evento coronario, y determinar si estos niveles tienen valor pronóstico diferencial en individuos con SAHS.

Para ello, se incluyeron 538 individuos tras un síndrome coronario agudo, y se les practicó un estudio de sueño (poligrafía) durante las 72 horas después del ingreso para clasificarlos entre SAHS (N=312) y no SAHS (N=226). Se registraron las variables antropométricas, datos

clínicos. En una extracción venosa de sangre la mañana siguiente al IAM se midieron las concentraciones de PIGF mediante inmunoensayo. Durante el ingreso también se evaluaron la gravedad del IAM y su pronóstico a corto plazo.

4.1.2. Resultados y discusión del primer estudio

Se evaluó el impacto del SAHS en los niveles del factor de crecimiento placentario (PIGF) en la sangre venosa de individuos tras un síndrome coronario agudo (SCA), así como la influencia del SAHS en la utilidad del PIGF como biomarcador de gravedad del SCA, (mediante estudio de la puntuación Killip, el número de vasos afectados y la fracción de eyección) y también su utilidad para predecir complicaciones a corto plazo tras un SCA.

En esta cohorte de pacientes tras un SCA, se observó que los individuos con SAHS eran de mayor edad, con mayor prevalencia de hipertensión y mayor índice de masa corporal (IMC) que aquellos sin SAHS. Tras ajustar por posibles variables de confusión (edad, IMC, hábito tabáquico e hipertensión) se vio que las concentraciones plasmáticas de PIGF eran mayores en el grupo de SAHS, y que correlacionaban con el índice de apnea-hipopnea (IAH). Además de su asociación con el SAHS, los pacientes con mayores niveles de PIGF tenían un mayor riesgo de presentar de 3 vasos dañados o más, así como un valor de Killip superior a 1.

Nuestros resultados sugieren que, en pacientes tras un SCA, concentraciones plasmáticas incrementadas de PIGF están asociadas con la presencia de SAHS y con situaciones adversas a corto plazo. Estos hallazgos sugieren que puede haber diferentes mecanismos fisiopatológicos que afecten a la expresión y liberación de PIGF a nivel cardiaco tras daño isquémico, así como a su papel predictivo en los pacientes con OSA.

Incluso, con base en nuestros resultados, y dado que está descrito que el PIGF está relacionado con la remodelación cardiaca y con la revascularización y regeneración del miocardio, se podría plantear que los niveles incrementados de PIGF que se han visto en los

individuos con SAHS podría implicar una mejora a largo plazo para la función cardíaca de estos pacientes tras el evento coronario.

RESEARCH ARTICLE

Impact of Obstructive Sleep Apnea on the Levels of Placental Growth Factor (PIGF) and Their Value for Predicting Short-Term Adverse Outcomes in Patients with Acute Coronary Syndrome

Antonia Barcelo¹, Josep Miquel Bauça^{1*}, Aina Yañez¹, Laura Fueyo¹, Cristina Gomez¹, Monica de la Peña¹, Javier Pierola¹, Alberto Rodriguez¹, Manuel Sanchez-de-la-Torre², Jorge Abad³, Olga Mediano⁴, Jose Amilibia⁵, Maria Jose Masdeu⁶, Joaquin Teran⁷, Josep Maria Montserrat⁸, Mercè Mayos⁹, Alicia Sanchez-de-la-Torre², Ferran Barbé², Spanish Sleep Group[†]

1 Hospital Universitari Son Espases, Palma, Illes Balears, Spain, **2** Hospital Universitari Arnau de Vilanova and Santa Maria, IRBLleida, Lleida, Catalonia, Spain, **3** Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Catalonia, Spain, **4** Hospital Universitario de Guadalajara, Guadalajara, Castilla-La Mancha, Spain, **5** Hospital Universitario Cruces, Bilbao, Basque Country, Spain, **6** Hospital Parc Taulí, Sabadell, Catalonia, Spain, **7** Hospital General Yagüe, Burgos, Castilla-León, Spain, **8** Hospital Clínic, Barcelona, Catalonia, Spain, **9** Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Catalonia, Spain

[†] Membership of the Spanish Sleep Group is provided in the Acknowledgments.

* pepmiquel@gmail.com



CrossMark
click for updates

OPEN ACCESS

Citation: Barcelo A, Bauça JM, Yañez A, Fueyo L, Gomez C, de la Peña M, et al. (2016) Impact of Obstructive Sleep Apnea on the Levels of Placental Growth Factor (PIGF) and Their Value for Predicting Short-Term Adverse Outcomes in Patients with Acute Coronary Syndrome. PLoS ONE 11(3): e0147686. doi:10.1371/journal.pone.0147686

Editor: Andrea Romigi, University of Rome Tor Vergata, ITALY

Received: September 8, 2015

Accepted: January 7, 2016

Published: March 1, 2016

Copyright: © 2016 Barcelo et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are available on Figshare: https://figshare.com/articles/PIGF_and_Sleep_Apnea/2113396/1.

Funding: Supported by: ResMed Ltd. (Australia), Fondo de Investigación Sanitaria (PI10/02763 and PI10/02745), the Spanish Respiratory Society (SEPAR), the Catalanian Cardiology Society, Esteve-Teijin (Spain), Oxigen Salud (Spain), and ALLER.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

Background

Placental growth factor (PIGF) induces angiogenesis and promotes tissue repair, and plasma PIGF levels change markedly during acute myocardial infarction (AMI). Currently, the impact of obstructive sleep apnea (OSA) in patients with AMI is a subject of debate. Our objective was to evaluate the relationships between PIGF levels and both the severity of acute coronary syndrome (ACS) and short-term outcomes after ACS in patients with and without OSA.

Methods

A total of 538 consecutive patients (312 OSA patients and 226 controls) admitted for ACS were included in this study. All patients underwent polygraphy in the first 72 hours after hospital admission. The severity of disease and short-term prognoses were evaluated during the hospitalization period. Plasma PIGF levels were measured using an electrochemiluminescence immunoassay.

Results

Patients with OSA were significantly older and more frequently hypertensive and had higher BMIs than those without OSA. After adjusting for age, smoking status, BMI and

Abbreviations: ACS, Acute coronary syndrome; AHI, Apnea-hypopnea index; CPAP, Continuous positive airway pressure; AMI, Acute myocardial infarction; ESS, Epworth sleepiness scale; BMI, Body mass index; CU, Coronary unit; CV, Cardiovascular; ODI, Oxygen desaturation index; OSA, Obstructive sleep apnea; MI, Myocardial infarction; PlGF, Placental growth factor; SaO₂, Oxygen saturation; OR, odds ratio; STEMI, ST segment elevation myocardial infarction; VEGF, Vascular endothelial growth factor.

hypertension, PlGF levels were significantly elevated in patients with OSA compared with patients without OSA (19.9 pg/mL, interquartile range: 16.6–24.5 pg/mL; 18.5 pg/mL, interquartile range: 14.7–22.7 pg/mL; $p < 0.001$), and a higher apnea-hypopnea index (AHI) was associated with higher PlGF concentrations ($p < 0.003$). Patients with higher levels of PlGF had also an increased odds ratio for the presence of 3 or more diseased vessels and for a Killip score > 1 , even after adjustment.

Conclusions

The results of this study show that in patients with ACS, elevated plasma levels of PlGF are associated with the presence of OSA and with adverse outcomes during short-term follow-up.

Trial Registration

ClinicalTrials.gov [NCT01335087](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT01335087)

Introduction

Recent data suggest that obstructive sleep apnea (OSA) is underdiagnosed in patients after acute myocardial infarction (AMI) [1]. Intermittent episodes of hypoxia and arousals cause an increase in sympathetic activity, oxidative stress, hypercoagulability and cardiac hyperexcitability that could aggravate the severity of AMI and worsen the short-term prognosis of OSA patients [2–4]. Nevertheless, a cardioprotective role of OSA in the context of AMI, via ischemic preconditioning, has also been postulated [5]. Such protection would require the activation of adaptive mechanisms, such as increased recruitment of proliferative and angiogenic endothelial progenitor cells [6].

With the emergence of novel biomarkers, it may be feasible to characterize different aspects of the pathophysiology of acute coronary syndrome (ACS) [7,8]. Placental growth factor (PlGF), a member of the vascular endothelial growth factor family (VEGF), is expressed in cells of the cardiovascular system and plays a predominant role in pathological angiogenesis without affecting quiescent vessels in healthy organs [9,10]. PlGF expression increases in the damaged human heart, and PlGF levels in blood increase after AMI [11]. Elevated PlGF levels have emerged as an important, independent marker of short-term adverse outcomes in patients with ACS [12]. In contrast, PlGF plasma levels in the acute phase after myocardial infarction (MI) have been found to be positively correlated with the degree of improvement in left ventricular function that occurs during the chronic phase of MI; this finding suggests that PlGF may be involved in repairing injured myocardial tissue [13]. Cardiac PlGF expression is induced by hypoxia, and it has been suggested that PlGF is a stress-response factor that suppresses pathological remodeling in the heart by inducing angiogenesis, cardiomyocyte growth and peripheral mobilization of mononuclear cells and bone marrow-derived stem cells towards ischemic myocardial tissue [11]. Recent evidence demonstrates that PlGF is a crucial mediator of adaptive cardiac remodeling after myocardial infarction, and it has been suggested that the effects of PlGF could form the basis of a potential therapeutic strategy in the future [14].

The purpose of this study was to assess the impact of OSA on circulating PlGF levels in patients with ACS and to determine whether PlGF levels have short-term prognostic significance in patients with OSA compared with patients without OSA.

Materials and Methods

Patients

The Ethics Committee of each participating center approved the study: the Comitè Ètic d'Investigació (Hospital Universitari Son Espases, Palma), the Comité Ético de Investigación Clínica de Euskadi (Hospital de Cruces, Bilbao), the Comité Ético de Investigación Clínica (Hospital Arnau de Vilanova i Santa Maria, Lleida), the Comitè Ètic d'Investigació Clínica (Hospital Germans Trias i Pujol, Barcelona), the Comité Ético de Investigación Clínica (Hospital General Universitario de Guadalajara, Guadalajara), the Comitè Ètic d'Investigació Clínica (Hospital Parc Taulí, Sabadell), the Comité Ético de Investigación Clínica de Burgos y Soria (Hospital General Yagüe, Burgos), and the Comitè Ètic d'Investigació Clínica (Hospital Clínic, Barcelona). All patients provided written, informed consent.

This is an ancillary study of the ISAACC Study (NCT01335087), a multicenter, open-label, parallel, prospective, randomized, controlled trial [15]. The ISAACC study is evaluating the effects of CPAP treatment on the incidence of new cardiovascular events in patients with an episode of ACS and OSA. The ISAACC study includes non-sleepy patients because it is unethical to fail to treat OSA patients with excessive daytime sleepiness. The first patient was included in April 2011, so in spite of newer guidelines regarding the sleep apnea definitions [16], the recruitment of patients was consistent as originally established for ISAACC, and published elsewhere [15;17]. For the present study, we included 538 patients (men and women age ≥ 18 years old) who were admitted for ACS to coronary care units or cardiology hospitalization wards from fourteen teaching hospitals in Spain. A polygraphic study was performed during the first 48–72 h after admission. The case ($n = 312$) or control ($n = 226$) status of each ACS patient was defined using an apnea-hypopnea index (AHI) threshold of 15 or greater. ACS was defined as the acute presentation of coronary disease, with or without ST-elevation, unstable angina, or MI type 1 [17]. The exclusion criteria for this study were the following: previous CPAP treatment; psychophysical inability to complete questionnaires; the presence of any previously diagnosed sleep disorder; $>50\%$ of apneas consisting of central apneas or the presence of Cheyne-Stokes respiration; the presence of daytime sleepiness (Epworth Sleep Scale [ESS] score >10); the presence of chronic diseases, including neoplasms, renal insufficiency ($\text{GFR} < 15 \text{ mL/min/1.73 m}^2$), severe COPD ($\text{FEV}_1 < 50\%$), chronic depression, and other limiting chronic diseases; a medical history that could interfere with the objectives of the study; and any processes, whether cardiovascular or otherwise, that reduced life expectancy to <1 year; and patients in cardiogenic shock.

Procedures

The diagnosis of OSA was based on the results of a sleep test, in accordance with the guidelines of the Spanish national consensus on apnea-hypopnea syndrome [18]. All participating centers used the same model of polygraph (Embletta; ResMed, Australia) for the diagnosis of OSA. Oronasal flow, thoracoabdominal movements, ECG, and pulse oximetry were recorded. Apnea is defined as an absence of airflow lasting ≥ 10 seconds. Hypopnea is defined as a reduction in airflow lasting ≥ 10 seconds and is associated with oxygen desaturation. Oxygen desaturation (ODI) is considered as a decrease in $\text{SaO}_2 > 4\%$. The apnea-hypopnea index is defined as the number of apneas and hypopneas per hour of sleep. The extent of self-reported sleepiness/drowsiness was analyzed using the Spanish version of the ESS test [19]. Echocardiographic evaluations and Killip classification were performed routinely at hospital admission. During hospitalization, we evaluated the severity of ACS and each patient's short-term prognosis, in terms of the ejection fraction, the Killip score, the number of affected vessels, the average and

peak troponin levels, and complications related to the cardiovascular event itself (heart failure, reinfarction, mechanic complications such myocardial rupture, arrhythmia and stroke) and mortality. Other complications related to the ICU admission were excluded, such as infections or venous thrombosis following immobilization, since they were not due to the cardiovascular event for which the patient was admitted.

Blood sampling and analysis

Peripheral blood samples were collected from all subjects after the polygraphic study at the time of randomization. Plasma and serum samples were stored at -80°C until analysis. Cardiac marker levels were measured by investigators who were blinded to the patients' histories. Blood chemistry data were measured using commercially available assays. PIGF levels were measured in plasma using an enzyme-based electrochemiluminescence assay (Roche Diagnostics, Germany). The lower limit of detection was 3 pg/mL, and the upper limit of detection was 10.000 pg/mL. The intra-assay coefficient of variation was 1.1%, and the inter-assay coefficient of variation 2.6%.

Data analysis

Data on the patients included in this study were incorporated into a password-protected database. The mean values (and standard deviations) or frequencies (and percentages) were computed to evaluate the differences between the control and OSA patients, and the significance of differences was assessed using Mann-Whitney tests (or t tests, if data were normally distributed) or chi-squared tests, respectively. OSA patients were divided into 3 groups according to AHI, and the Kruskal-Wallis test was used for comparisons among groups. Spearman's rank correlations were calculated to assess correlations. The associations among PIGF levels, OSA, and variables related to the severity of ACS were assessed using the Mann-Whitney or chi-squared tests and linear or logistic regression models, as appropriate. Additionally, the models were adjusted for smoking status (current or former smoker vs non-smoker), body mass index, age, gender (male vs female), hypertension, diabetes and dyslipidemia.

Odds ratios, their corresponding 95% confidence intervals, and p-values were calculated using logistic regression models; adjusted p-values were also computed. The threshold for statistical significance was set at $p < 0.05$. SPSS v19 software (IBM Corp., Armonk, NY) was used for all analyses.

Results

The clinical and sleep-related characteristics of the patients are given in [Table 1](#).

OSA was detected in 58% of the study subjects (312 patients and 226 controls).

Patients with OSA were significantly older and had higher BMIs compared with those without OSA. No difference was detected between genders ([Table 1](#)). The number of hypertensive patients was significantly higher in the OSA group ([Table 1](#)). The number of patients who took antihypertensive drugs, particularly diuretics and calcium agonists, was higher in the OSA group.

PIGF levels were higher in patients with OSA compared with patients without OSA (19.9 pg/mL, interquartile range: 16.6–24.5 pg/mL; 18.5 pg/mL, interquartile range: 14.7–22.7 pg/mL; $p < 0.001$).

PIGF levels were correlated with age ($r = 0.304$, $p < 0.001$), AHI ($r = 0.142$, $p = 0.001$), Min SaO₂ ($r = -0.091$, $p = 0.038$), ODI ($r = 0.128$, $p = 0.004$), troponin concentration ($r = 0.171$, $p < 0.001$) and mean peak troponin level ($r = 0.161$, $p = 0.001$). To investigate the strength of the association between PIGF levels and OSA severity, patients were classified into 3 groups according to AHI. The results showed that PIGF levels increased with AHI even after adjustment. PIGF levels were statistically different among the three groups and higher in the

Table 1. Anthropometric, clinical and biochemical variables for patients with obstructive sleep apnea (OSA) and controls.

	Controls(n = 226)	OSA(n = 312)	p-value
Age, years	56.5±11.5	61.2±10.3	<0.001
Male, %	191 (84.5%)	250 (80.1%)	0.192
AHI, h ⁻¹	6.3±4.1	35.7±17.4	<0.001
ODI, h ⁻¹	9.3±17.9	24.9±16.9	<0.001
Mean SaO ₂ , %	93.6±2.2	92.7±2.2	<0.001
Min SaO ₂ , %	86.7±5.2	82.1±7.2	<0.001
Time with SaO ₂ <90%, %	4.2±11.5	11.2±18.0	<0.001
BMI, kg•m ⁻²	26.1±6.1	28.3±6.2	<0.001
Glucose, mg/dL	119±53	128±59	0.078
HDL cholesterol, mg/dL	45±30	40±18	0.058
LDL cholesterol, mg/dL	116±41	110±33	0.103
Triglyceride, mg/dL	154±117	141±79	0.161
Hypertension	87 (38.5%)	178 (57.1%)	<0.001
Diabetes mellitus	50 (22.1%)	83 (26.6%)	0.243
Dyslipidemia	108 (47.8%)	134 (42.9%)	0.265
Smoker			0.163
No	57 (25.2%)	103 (32.8%)	
Yes	107 (47.3%)	134 (42.7%)	
Former smoker	62 (27.4%)	77 (24.5%)	
Diuretics	28 (12.5%)	67 (21.4%)	0.008
Anticoagulants	6 (2.7%)	22 (7.1%)	0.025
Antacids	47 (20.9%)	96 (30.8%)	0.011
Hypolipidemic agents	68 (30.4%)	126 (40.4%)	0.017
β-blockers	44 (19.8%)	77 (24.7%)	0.186
Calcium antagonists	9 (4.0%)	44 (14.2%)	<0.001
ACEIs	14 (18.9%)	29 (22.5%)	0.050
Insulin	10 (4.5%)	29 (9.3%)	0.034
Oral antidiabetic agents	37 (16.5%)	61 (19.6%)	0.361
Bronchodilators	16 (7.1%)	12 (3.8%)	0.091

Values represent the percentage of the patients and control subjects or means ± standard deviations. AHI, apnea-hypopnea index; ODI, oxygen desaturation index; BMI, body mass index; HDL, high-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein; ACEIs, angiotensin-converting enzyme inhibitors.

doi:10.1371/journal.pone.0147686.t001

AHI ≥ 30 group (19.9 pg/mL, interquartile range: 17.5–24.8) than both the AHI 15–29.9 group (19.3 pg/mL, interquartile range: 16.2–23.5) and the AHI ≤ 15 group (18.2 pg/mL, interquartile range: 14.7–22.1); (p < 0.003; Fig 1).

To further assess the associations of variables related to sleep and to the severity of ACS with PIGF levels, we classified the study participants into two groups according to PIGF concentrations (Table 2). A cutoff value of 20 pg/mL for PIGF levels was used based on prior studies [20]. Using this cut-off value, we found that up to 156 patients with OSA had PIGF levels > 20, which represent 63.7% of patients with PIGF ≥ 20 pg/mL. By contrast, the number of non-OSA patients with PIGF levels ≥ 20 pg/mL was 81, which represent 36.3% of patients with PIGF ≥ 20 pg/mL.

There were no differences in the trend for the ACS category and OSA (unstable angina was present in 14.8% of controls and 13.3% of OSA; NSTEMI in 42.6% of controls and 41.5% of OSA; STEMI in 42.6% of controls and 45.2% of OSA). No significant association was detected between ACS category and PIGF levels.

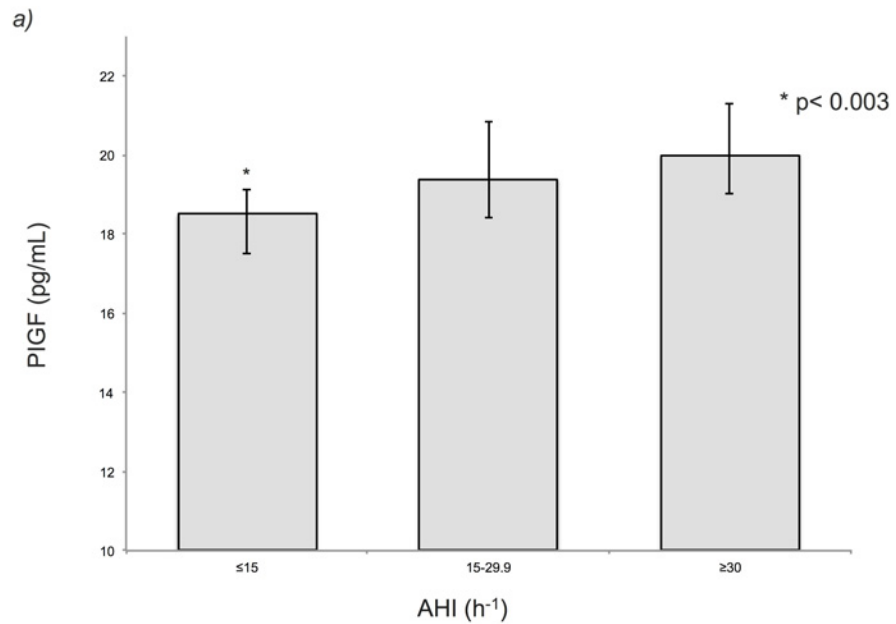


Fig 1. Levels of PIGF according to AHI groups. Error bars represent 95% confidence intervals. The Kruskal-Wallis test was used for comparisons among groups.

doi:10.1371/journal.pone.0147686.g001

Patients with elevated PIGF levels were more frequently older and hypertensive, and with respect to ACS severity, the percentages of patients with Killip score >1 and with 3 or more diseased vessels were higher in the high-PIGF group (Table 2).

In a multivariable analysis, PIGF, together with all baseline characteristics that were found to be predictive in univariate analyses, persisted as independent predictors of severity and

Table 2. Baseline patient characteristics and variables related to the severity of acute coronary syndrome according to PIGF status.

	PIGF<20 pg/mL (n = 301)	PIGF≥20 pg/mL (n = 237)	p-value
Age, years	57.0 ± 11.0	61.8 ± 10.5	<0.001
Male, %	245(81.9%)	192 (81.6%)	0.927
OSA	160 (53.3%)	156 (63.7%)	0.015
BMI, kg•m ⁻²	27.3 ± 6.3	27.5 ± 6.2	0.653
Hypertension	135 (44.7%)	132 (55.2%)	0.015
Diabetes mellitus	71 (23.6%)	61 (25.7%)	0.565
Dyslipidemia	167 (55.5%)	129 (54.4%)	0.808
Smoker			0.138
No	86 (28.5%)	75 (31.5%)	
Yes	147 (48.7%)	96 (40.3%)	
Former smoker	69 (22.8%)	67 (28.2%)	
Number of diseased vessels ≥3	48 (17.6%)	65 (30.2%)	<0.001
Killip score >1	12 (5.0%)	23 (12.9%)	0.004
Ejection fraction <51.5%*	58 (25.8%)	40 (23.4%)	0.586
Peak troponin level≥724.5 ng/mL*	57 (24.4%)	45 (26.0%)	0.704
CV complications during hospitalization	16 (5.15%)	23 (9.2%)	0.059

PIGF, placental growth factor; OSA, obstructive sleep apnea; BMI, body mass index; CV, cardiovascular.

*Optimal threshold to discriminate between OSA and control patients [16].

doi:10.1371/journal.pone.0147686.t002

Table 3. Multivariate adjusted odds ratios for Killip score >1.

	OR (95% CI) Not adjusted	p-value	OR (95% CI) Multivariate model ¹	p-value	OR (95% CI) Multivariate model ²	p-value
Age	1.04 (1.01–1.08)	0.013	1.01 (0.97–1.05)	0.576	1.01 (0.97–1.05)	0.593
Gender	0.53 (0.24–1.15)	0.107	0.63 (0.26–1.55)	0.314	0.63 (0.26–1.54)	0.309
Smoking	0.54 (0.26–1.09)	0.087	0.85 (0.36–1.99)	0.702	0.89 (0.38–2.09)	0.781
BMI	1.00 (0.95–1.06)	0.906	0.98 (0.93–1.04)	0.547	0.98 (0.93–1.03)	0.456
Hypertension	3.82 (1.69–8.62)	0.001	2.59 (1.02–6.56)	0.045	2.32 (0.90–5.97)	0.080
Diabetes	2.47 (1.22–5.03)	0.012	1.79 (0.82–3.89)	0.141	1.80 (0.82–3.92)	0.143
Dyslipidemia	1.43 (0.70–2.88)	0.325	1.07 (0.51–2.27)	0.858	1.11 (0.52–2.37)	0.787
OSA	2.07 (0.97–4.41)	0.060	-	-	1.83 (0.80–4.20)	0.155
PIGF ≥ 20 pg/mL	3.13 (1.34–7.34)	0.009	2.67 (1.25–5.69)	0.011	2.70 (1.26–5.77)	0.011

¹ Multivariate model adjusted for age, gender (male vs female), smoking (current or former smoker vs non-smoker), BMI, hypertension, diabetes, dyslipidemia.

² Multivariate model adjusted for age, gender (male vs female), smoking (current or former smoker vs non-smoker), BMI, hypertension, diabetes, dyslipidemia and OSA.

doi:10.1371/journal.pone.0147686.t003

short-term outcome (Tables 3 and 4). Patients with higher levels of PIGF had increased odds ratios for a Killip classification >1 (Table 3, ORs 3.13, $p = 0.009$; and ORs 2.67, $p = 0.011$) and for the presence of 3 or more diseased vessels (Table 4, ORs 2.02, $p = 0.001$; and ORs 1.85, $p = 0.009$) even after adjustment.

The number of cardiovascular complications (heart failure, reinfarction, mechanic complications, arrhythmia and stroke) tended to be higher in the high-PIGF group. However, the multivariate analysis revealed that despite the fact that patients with OSA had high PIGF levels, when assessing the associations between these ACS severity-related variables and high PIGF levels, there were no statistically significant differences after adjustment for OSA (Table 3 and Table 4). In addition, no significant interactions were seen between PIGF levels and the effect of OSA with respect to other clinical outcomes such as the length of stay in the coronary unit, length of hospitalization, ejection fraction, number of stents implanted or peak of troponin ($p > 0.05$).

Table 4. Multivariate adjusted odds ratios for ≥ 3 diseased vessels.

	OR (95% CI) Not adjusted	p-value	OR (95% CI) Multivariate model ¹	p-value	OR (95% CI) Multivariate model ²	p-value
Age	1.03 (1.01–1.05)	0.005	1.02 (0.99–1.04)	0.213	1.01 (0.99–1.04)	0.264
Gender	1.94 (1.01–3.72)	0.047	2.84 (1.38–5.83)	0.005	2.86 (1.39–5.90)	0.004
Smoking	0.66 (0.42–1.04)	0.073	0.70 (0.42–1.16)	0.168	0.70 (0.42–1.17)	0.172
BMI	1.02 (0.98–1.06)	0.390	1.02 (0.98–1.06)	0.461	1.01 (0.97–1.06)	0.541
Hypertension	2.27 (1.47–3.50)	<0.001	1.60 (0.96–2.67)	0.070	1.56 (0.93–2.62)	0.088
Diabetes	2.78 (1.77–4.38)	<0.001	2.27 (1.38–3.75)	0.001	2.27 (1.37–3.74)	0.001
Dyslipidemia	1.61 (1.05–2.48)	0.030	1.34 (0.84–2.15)	0.219	1.35 (0.84–2.16)	0.213
OSA	1.57 (1.01–2.40)	0.045	-	-	1.25 (0.77–2.03)	0.367
PIGF level ≥ 20 ng/L	2.02 (1.32–3.10)	0.001	1.85 (1.16–2.94)	0.009	1.83 (1.15–2.91)	0.011

¹ Multivariate model adjusted for age, gender (male vs female), smoking (current or former smoker vs non-smoker), BMI, hypertension, diabetes, dyslipidemia.

² Multivariate model adjusted for age, gender (male vs female), smoking (current or former smoker vs non-smoker), BMI, hypertension, diabetes, dyslipidemia and OSA.

doi:10.1371/journal.pone.0147686.t004

Discussion

The results of this study show that in patients with ACS, elevated plasma levels of PIGF are associated with the presence of OSA and with adverse outcomes during short-term follow-up. The present findings suggest that the presence of OSA may affect the clinical significance of PIGF in patients with ACS.

PIGF is an established prognostic marker in ACS. However, no study has specifically examined its prognostic capabilities in OSA patients with ACS.

In a previous study, we observed that OSA influences the severity of ACS and its short-term prognosis. OSA was correlated with an increase in peak plasma troponin levels, with the number of diseased vessels and with the length of stay in the coronary unit [17]. In this study, we observed that in patients with ACS, higher PIGF levels were associated with adverse short-term outcomes (greater numbers of diseased vessels, higher Killip scores and a tendency to develop more cardiovascular complications). These observations suggest that different pathophysiological mechanisms may be responsible for the expression of PIGF in patients with and without OSA and that these mechanisms may affect short- and long-term risks after ACS in different ways.

PIGF, a member of the VEGF family of angiogenic proteins, plays an important role in pathological angiogenesis [21]. Although PIGF and VEGF activate similar signaling pathways, PIGF exhibits greater disease-specific activity than VEGF does, while it does not affect quiescent vessels in healthy tissues. In addition to enhancing angiogenesis, PIGF is known to improve cardiac performance by promoting cardiomyocyte survival and cardiomyogenesis via recruitment of bone marrow-derived progenitor cells towards infarcted myocardial tissue [22]. Hypoxia is an important stimulus of PIGF expression, and hypoxia inducible factor-1-alpha (HIF-1 α) can directly activate its transcription [10;13]. High PIGF release typically accompanies acute ischemia and infarction, but elevated levels may reflect underlying acute or chronic hypoxia. Our results demonstrate that OSA is an important determinant of PIGF levels in patients with ACS. Among several confounding factors, OSA seems to mediate a portion of the release of PIGF detected in these patients. In line with this data, PIGF may represent a valuable marker of OSA in patients suspected of having acute coronary syndrome. Furthermore, the presence of OSA may affect the prognostic value of PIGF levels, and this possibility should be considered in studies in which PIGF is used as a clinical biomarker for risk stratification.

There is evidence that OSA may be associated with the activation of cardiovascular adaptive mechanisms. Berger et al reported that the numbers of endothelial progenitor cells are elevated and that angiogenesis increases in patients with AMI and coexistent OSA compared with patients with AMI without OSA [6]. EPCs are mobilized by signaling pathways, such as the HIF-1 α pathway, which are also activated in OSA [23] [24]. HIF-1 α stimulates the production of VEGF, and several studies have shown that patients with OSA have increased levels of VEGF [25]. In contrast, another study found that although VEGF expression in monocytes was found to be higher in patients with AMI and OSA compared with patients with AMI without OSA, no difference was reported for plasma VEGF levels between these groups [6]. On the other hand, earlier studies, which demonstrated that PIGF levels at presentation are of prognostic value for clinical outcomes in patients with ACS, did not find any correlation between PIGF levels and VEGF levels [12]. Thus far, the effect of OSA on plasma PIGF levels after ACS has not been investigated. In patients with ACS, plasma levels of PIGF increase acutely and transiently [12]. A single initial measurement of a patient's plasma PIGF level appears to extend the predictive and prognostic information gained from traditional risk markers [26]. The extent to which PIGF levels are elevated is influenced by the severity of myocardial damage, and the overall effects of PIGF may vary with disease status and comorbidities [27–29]. In this sense, OSA could be essential and may mediate a portion of the prognostic impact of PIGF,

given the relationship between PIGF levels after ACS and OSA that was observed in our study. However, it is known that OSA increases the incidence of morning peak of onset in acute myocardial infarction. Despite the fact that there are no data on whether PIGF has a diurnal pattern of variation, a perturbation in circadian PIGF balance might be a possible contributor to the onset of MI [30;31]. Furthermore, elevated PIGF levels may reflect underlying acute or chronic hypoxia. PIGF has potent angiogenic properties, especially under pathological circumstances, and increased PIGF levels could counteract the damaging effects of ischemia [21]. Iwama et al observed that patients with higher plasma PIGF levels on day 3 after AMI showed greater improvement in left ventricular ejection fraction (LEVF) during the chronic phase (6 months post MI) than did patients with lower plasma PIGF levels, and they also observed that patients with improvement in LEVF in the chronic phase had significantly higher plasma levels of PIGF in the acute phase compared with patients without improvement; these findings suggest that PIGF may be involved in repairing injured myocardial tissue [13]. In addition, experimental studies have demonstrated that PIGF may serve both as a marker of adaptive cardiac remodeling and as a promising novel therapeutic agent for revascularizing and regenerating the infarcted myocardium and for improving its performance after MI [14;22]. Consistent with these findings, it is possible that the elevated levels of PIGF detected in the group of patients with OSA could exert a beneficial effect that could promote long-term improvement in cardiac function after ACS in these patients.

Limitations

This study has several limitations. First, we excluded patients with daytime sleepiness, which were the patients who exhibited the most severe OSA. Second, OSA was diagnosed based on respiratory polygraphy, which could underestimate the severity of OSA. Third, the high variability in PIGF levels detected both in controls and patients may limit its usefulness. On the other hand, this study was performed only for patients with ACS. Previous clinical studies including subjects without ACS showed PIGF mean plasma levels of 10 pg/mL [13] and 16.6 pg/mL [31], both of them lower than in our ACS patients groups, either with or without OSA. Ideally, longitudinal studies measuring PIGF at the time of diagnosis of OSA would add to the verification of PIGF as a biomarker. Fourth, alternative noninvasive biomarkers of cardiac dysfunction, such as the brain natriuretic peptide (BNP), were not assessed. As reported elsewhere, PIGF and BNP levels are known to positively correlate in patients with ischemic cardiomyopathy [32]. This demonstrates an increase of PIGF with the severity of heart failure in such patients, regardless of OSA. Finally, the design of this study does not allow us to evaluate the long-term prognostic role of PIGF in OSA or to draw definitive conclusions.

Conclusions

The results of this study show that in patients with ACS, elevated plasma levels of PIGF are associated with the presence of OSA and with adverse outcomes during short-term follow-up. These findings suggest that different pathophysiological mechanisms might affect the cardiac expression of PIGF after ischemic injury, as well as their predictive role in patients with and without OSA.

Acknowledgments

Complete authors' affiliation: Antonia Barcelo (Servei d'Anàlisis Clíniques, Hospital Universitari Son Espases, Palma, Illes Balears, Spain; Institut d'Investigació Sanitària de Palma (IdISPA), Palma, Illes Balears, Spain; Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Madrid, Spain), Josep Miquel Bauça (Servei d'Anàlisis Clíniques, Hospital Universitari Son Espases, Palma, Illes Balears, Spain; Institut d'Investigació Sanitària

de Palma (IdISPa), Palma, Illes Balears, Spain), Aina Yañez (Institut d'Investigació Sanitària de Palma (IdISPa), Palma, Illes Balears, Spain), Laura Fueyo (Servei d'Anàlisis Clíniques, Hospital Universitari Son Espases, Palma, Illes Balears, Spain), Cristina Gomez (Servei d'Anàlisis Clíniques, Hospital Universitari Son Espases, Palma, Illes Balears, Spain), Monica de la Peña (Servei de Pneumologia, Hospital Universitari Son Espases, Palma, Illes Balears, Spain; Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Madrid, Spain), Javier Pierola (Institut d'Investigació Sanitària de Palma (IdISPa), Palma, Illes Balears, Spain), Alberto Rodriguez (Servei de Medicina Intensiva, Hospital Universitari Son Espases, Palma, Illes Balears, Spain), Manuel Sanchez-de-la-Torre (Servei de Pneumologia, Hospital Universitari Arnau de Vilanova and Santa Maria, IRBLleida, Lleida, Catalonia, Spain; Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Madrid, Spain), Jorge Abad (Servei de Pneumologia, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Catalonia, Spain), Olga Mediano (Servicio de Neumología, Hospital Universitario de Guadalajara, Guadalajara, Castilla-La Mancha, Spain), Jose Amilibia (Servicio de Neumología, Hospital Universitario Cruces, Bilbao, Basque Country, Spain), Maria Jose Masdeu (Servei de Pneumologia, Hospital Parc Taulí, Sabadell, Catalonia, Spain), Joaquin Teran (Servicio de Neumología, Hospital General Yagüe, Burgos, Castilla-León, Spain), Josep Maria Montserrat (Servei de Pneumologia, Hospital Clínic, Barcelona, Catalonia, Spain), Mercè Mayos (Servei de Pneumologia, Hospital Universitari Arnau de Vilanova and Santa Maria, IRBLleida, Lleida, Catalonia, Spain), Alicia Sanchez-de-la-Torre (Servei de Pneumologia, Hospital Universitari Arnau de Vilanova and Santa Maria, IRBLleida, Lleida, Catalonia, Spain; Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Madrid, Spain) and Ferran Barbé (Servei de Pneumologia, Hospital Universitari Arnau de Vilanova and Santa Maria, IRBLleida, Lleida, Catalonia, Spain; Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Madrid, Spain).

This work was supported by ResMed Ltd. (Australia), Fondo de Investigación Sanitaria, Spain, (PI10/02763 and PI10/02745), the Spanish Respiratory Society (SEPAR), the Catalanian Cardiology Society, Esteve-Teijin (Spain), Oxigen Salud (Spain), and ALLER.

The members of the Spanish Sleep and Breathing Group are: Amanda López-Picado, pharmacist, Araba Research Unit, Hospital Universitario Txagorritxu, Vitoria; Erika Miranda-Serrano, statistician, Araba Research Unit, Hospital Universitario Txagorritxu; Cristina Martinez-Null, biologist, Sleep Unit, Hospital Universitario, Vitoria and Ciber de Enfermedades Respiratorias (CibeRes); Ramón Rubio, neurologist, Hospital Universitario Txagorritxu, Vitoria and CibeRes; Maria Luz Alonso, respiratory physician, Hospital General Yagüe, Burgos and CibeRes; José Cordero, epidemiologist, Hospital General Yagüe, Burgos; Cristobal Esteban, respiratory physician, Hospital de Galdakano, Vizcaya; Antonio Jiménez, respiratory physician, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander; Maria Rosario Carpizo, neurophysiologist, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander; Gabriel Sanpol, respiratory physician, Hospital Valle de Hebrón, Barcelona and CibeRes; Jaime Corral, respiratory physician, Hospital San Pedro de Alcántara, Cáceres and CibeRes; Manola Rubio, respiratory physician, Hospital San Pedro de Alcántara, Cáceres; Antonia Barceló, clinical analyst, Hospital Son Dureta, Palma de Mallorca and CibeRes; Javier Piérola, biologist, Hospital Son Dureta, Palma de Mallorca and CibeRes; José María Marín, respiratory physician, Hospital Universitario Miguel Servet, Zaragoza and CibeRes.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: AB FB. Performed the experiments: JMB LF CG JP. Analyzed the data: AY AB FB. Contributed reagents/materials/analysis tools: MP AR MS J.

Abad OM J, Amilibia MJM JT JMM MM AS. Wrote the paper: AB JMB AY FB. Guarantor and lead investigator of the study: FB.

References

1. Ludka O, Stepanova R, Vyskocilova M, Galkova L, Mikolaskova M, et al.: Sleep apnea prevalence in acute myocardial infarction—the Sleep Apnea in Post-acute Myocardial Infarction Patients (SAPAMI) Study. *Int J Cardiol* 2014; 176:13–19. doi: [10.1016/j.ijcard.2014.06.020](https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2014.06.020) PMID: [25064202](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25064202/)
2. Sanchez-de-la-Torre M, Campos-Rodriguez F, Barbe F: Obstructive sleep apnoea and cardiovascular disease. *Lancet Respir Med* 2013; 1:61–72. doi: [10.1016/S2213-2600\(12\)70051-6](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(12)70051-6) PMID: [24321805](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24321805/)
3. Kohler M, Stradling JR: Mechanisms of vascular damage in obstructive sleep apnea. *Nat Rev Cardiol* 2010; 7:677–685. doi: [10.1038/nrcardio.2010.145](https://doi.org/10.1038/nrcardio.2010.145) PMID: [21079639](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21079639/)
4. Kuniyoshi FH, Garcia-Touchard A, Gami AS, Romero-Corral A, van der WC, Pusalavidyasagar S, et al.: Day-night variation of acute myocardial infarction in obstructive sleep apnea. *J Am Coll Cardiol* 2008; 52:343–346. doi: [10.1016/j.jacc.2008.04.027](https://doi.org/10.1016/j.jacc.2008.04.027) PMID: [18652941](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18652941/)
5. Shah N, Redline S, Yaggi HK, Wu R, Zhao CG, Ostfeld R, et al.: Obstructive sleep apnea and acute myocardial infarction severity: ischemic preconditioning? *Sleep Breath* 2012.
6. Berger S, Aronson D, Lavie P, Lavie L: Endothelial progenitor cells in acute myocardial infarction and sleep-disordered breathing. *Am J Respir Crit Care Med* 2013; 187:90–98. doi: [10.1164/rccm.201206-1144OC](https://doi.org/10.1164/rccm.201206-1144OC) PMID: [23155141](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23155141/)
7. Ramasamy I: Biochemical markers in acute coronary syndrome. *Clin Chim Acta* 2011; 412:1279–1296. doi: [10.1016/j.cca.2011.04.003](https://doi.org/10.1016/j.cca.2011.04.003) PMID: [21501603](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21501603/)
8. Kehl DW, Iqbal N, Fard A, Kipper BA, De La Parra LA, Maisel AS: Biomarkers in acute myocardial injury. *Transl Res* 2012; 159:252–264. doi: [10.1016/j.trsl.2011.11.002](https://doi.org/10.1016/j.trsl.2011.11.002) PMID: [22424429](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22424429/)
9. Carmeliet P, Moons L, Lutun A, Vincenti V, Compernelle V, De MM, et al.: Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med* 2001; 7:575–583. PMID: [11329059](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11329059/)
10. Liu X, Claus P, Wu M, Reyns G, Verhamme P, Pokreisz P, et al.: Placental growth factor increases regional myocardial blood flow and contractile function in chronic myocardial ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2013; 304:H885–H894. doi: [10.1152/ajpheart.00587.2012](https://doi.org/10.1152/ajpheart.00587.2012) PMID: [23316060](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23316060/)
11. Carnevale D, Lembo G: Placental growth factor and cardiac inflammation. *Trends Cardiovasc Med* 2012; 22:209–212. doi: [10.1016/j.tcm.2012.07.022](https://doi.org/10.1016/j.tcm.2012.07.022) PMID: [22925712](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22925712/)
12. Heeschen C, Dimmeler S, Fichtlscherer S, Hamm CW, Berger J, Simoons ML, et al.: Prognostic value of placental growth factor in patients with acute chest pain. *JAMA* 2004; 291:435–441. PMID: [14747500](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14747500/)
13. Iwama H, Uemura S, Naya N, Imagawa K, Takemoto Y, Asai O, et al.: Cardiac expression of placental growth factor predicts the improvement of chronic phase left ventricular function in patients with acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2006; 47:1559–1567. PMID: [16630991](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16630991/)
14. Accornero F, van Berlo JH, Benard MJ, Lorenz JN, Carmeliet P, Molkentin JD: Placental growth factor regulates cardiac adaptation and hypertrophy through a paracrine mechanism. *Circ Res* 2011; 109:272–280. doi: [10.1161/CIRCRESAHA.111.240820](https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.240820) PMID: [21636802](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21636802/)
15. Esquinas C, Sanchez-de-la Torre M, Aldoma A, Flores M, Martinez M, Barcelo A, et al.: Rationale and methodology of the impact of continuous positive airway pressure on patients with ACS and nonsleepy OSA: the ISAACC Trial. *Clin Cardiol* 2013; 36:495–501. doi: [10.1002/clc.22166](https://doi.org/10.1002/clc.22166) PMID: [23843147](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23843147/)
16. Berry RB, Budhiraja R, Gottlieb DJ, Gozal D, Iber C, Kapur VK, et al.: Rules for scoring respiratory events in sleep: update of the 2007 AASM Manual for the Scoring of Sleep and Associated Events. Deliberations of the Sleep Apnea Definitions Task Force of the American Academy of Sleep Medicine. *J Clin Sleep Med* 2012; 8:597–619. doi: [10.5664/jcsm.2172](https://doi.org/10.5664/jcsm.2172) PMID: [23066376](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23066376/)
17. Barbe F, Sanchez-de-la-Torre A, Abad J, Duran-Cantolla J, Mediano O, Amilibia J, et al.: Effect of obstructive sleep apnoea on severity and short-term prognosis of acute coronary syndrome. *Eur Respir J* 2015.
18. Spanish national Consensus in sleep Apnea-hypopnea syndrome(SAHS): *Arch Bronconeumol* 2005; 41:7–9.
19. Chiner E, Arriero JM, Signes-Costa J, Marco J, Fuentes I: [Validation of the Spanish version of the Epworth Sleepiness Scale in patients with a sleep apnea syndrome]. *Arch Bronconeumol* 1999; 35:422–427. PMID: [10596338](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10596338/)
20. Hochholzer W, Reichlin T, Stelzig C, Hochholzer K, Meissner J, Breidhardt T, et al.: Impact of soluble fms-like tyrosine kinase-1 and placental growth factor serum levels for risk stratification and early

- diagnosis in patients with suspected acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 2011; 32:326–335. doi: [10.1093/eurheartj/ehq429](https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehq429) PMID: [21138939](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21138939/)
21. Accornero F, Molkenin JD: Placental growth factor as a protective paracrine effector in the heart. *Trends Cardiovasc Med* 2011; 21:220–224. doi: [10.1016/j.tcm.2012.05.014](https://doi.org/10.1016/j.tcm.2012.05.014) PMID: [22902069](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22902069/)
 22. Iwasaki H, Kawamoto A, Tjwa M, Horii M, Hayashi S, Oyamada A, et al.: PIGF repairs myocardial ischemia through mechanisms of angiogenesis, cardioprotection and recruitment of myo-angiogenic competent marrow progenitors. *PLoS One* 2011; 6:e24872. doi: [10.1371/journal.pone.0024872](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024872) PMID: [21969865](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21969865/)
 23. Arnardottir ES, Mackiewicz M, Gislason T, Teff KL, Pack AI: Molecular signatures of obstructive sleep apnea in adults: a review and perspective. *Sleep* 2009; 32:447–470. PMID: [19413140](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19413140/)
 24. de la Peña M, Barcelo A, Barbe F, Pierola J, Pons J, Rimbau E, et al.: Endothelial function and circulating endothelial progenitor cells in patients with sleep apnea syndrome. *Respiration* 2008; 76:28–32. PMID: [17921670](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17921670/)
 25. Gozal D, Lipton AJ, Jones KL: Circulating vascular endothelial growth factor levels in patients with obstructive sleep apnea. *Sleep* 2002; 25:59–65. PMID: [11833862](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11833862/)
 26. Bui AH, Bonaca MP, Sabatine MS, Ray KK, Rifai N, Cannon CP, et al.: Elevated concentration of placental growth factor (PIGF) and long term risk in patients with acute coronary syndrome in the PROVE IT-TIMI 22 trial. *J Thromb Thrombolysis* 2012; 34:222–228. doi: [10.1007/s11239-012-0704-z](https://doi.org/10.1007/s11239-012-0704-z) PMID: [22446996](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22446996/)
 27. Tarnow L, Astrup AS, Parving HH: Elevated placental growth factor (PIGF) predicts cardiovascular morbidity and mortality in type 1 diabetic patients with diabetic nephropathy. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 2005; 240:73–79. PMID: [16112962](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16112962/)
 28. Theilade S, Lajer M, Jorsal A, Tarnow L, Parving HH, Rossing P: Evaluation of placental growth factor and soluble Fms-like tyrosine kinase 1 as predictors of all-cause and cardiovascular mortality in patients with Type 1 diabetes with and without diabetic nephropathy. *Diabet Med* 2012; 29:337–344. doi: [10.1111/j.1464-5491.2011.03482.x](https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.2011.03482.x) PMID: [21988672](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21988672/)
 29. Lenderink T, Heeschen C, Fichtlscherer S, Dimmeler S, Hamm CW, et al.: Elevated placental growth factor levels are associated with adverse outcomes at four-year follow-up in patients with acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol* 2006; 47:307–311. PMID: [16412852](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16412852/)
 30. Nakashima H, Henmi T, Minami K, Uchida Y, Shiraishi Y, Nunohiro T, et al.: Obstructive sleep apnoea increases the incidence of morning peak of onset in acute myocardial infarction. *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care* 2013; 2:153–158. doi: [10.1177/2048872613478557](https://doi.org/10.1177/2048872613478557) PMID: [24222825](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24222825/)
 31. Bagai K, Muldowney JA III, Song Y, Wang L, Bagai J, Artibeo KJ, et al.: Circadian variability of fibrinolytic markers and endothelial function in patients with obstructive sleep apnea. *Sleep* 2014; 37:359–367. doi: [10.5665/sleep.3414](https://doi.org/10.5665/sleep.3414) PMID: [24497664](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24497664/)
 32. Nakamura T, Funayama H, Kubo N, Yasu T, Kawakami M, Momomura S, et al.: Elevation of plasma placental growth factor in the patients with ischemic cardiomyopathy. *Int J Cardiol* 2009; 131:186–191. doi: [10.1016/j.ijcard.2007.10.050](https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2007.10.050) PMID: [18192038](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18192038/)

4.2. Segundo estudio

Bauça JM, Yañez A, Fueyo L, de la Peña M, Pierola J, Sánchez-de-la-Torre A, *et al.* Cell Death Biomarkers and Obstructive Sleep Apnea: Implications in the Acute Coronary Syndrome. *Sleep* 2017 1;40(5). doi: 10.1093/sleep/zsx049.

4.2.1. Presentación del segundo estudio

Los nucleosomas y el DNA de doble cadena (dsDNA) son elementos intracelulares que pueden ser vertidos al torrente circulatorio durante el proceso de muerte celular. Por ello, han sido sugeridos como biomarcadores prometedores para enfermedades relacionadas con el daño o muerte celular como el cáncer, enfermedades autoinmunes o síndrome coronario agudo (SCA), e incluso podrían correlacionar con la extensión del daño. Actualmente no se está bien establecido el impacto del síndrome de apneas-hipopneas del sueño (SAHS) en los pacientes con SCA.

Nuestra hipótesis era que el SAHS genera una situación de riesgo cardiovascular, que se traduce en unos niveles aumentados de biomarcadores de muerte celular en sangre y, cuando tiene lugar un infarto de miocardio, la destrucción celular masiva induce niveles todavía mayores de nucleosomas y de dsDNA.

Para ello, se propuso un diseño en dos ramas. En la primera parte del estudio se reclutaron individuos sin eventos coronarios previos en su historial médico, y se clasificaron en SAHS o no SAHS en función de los resultados de un estudio de sueño (polisomnografía completa; valor discriminante IAH: 10 h⁻¹), mientras que en la segunda parte del estudio se reclutaron individuos ingresados tras un SCA, a los que se les realizó una poligrafía y se clasificaron entre SCA o SCA+SAHS (valor discriminante: 15 h⁻¹). A todos ellos se registraron las variables

antropométricas relevantes y en la mañana siguiente al estudio de sueño se les realizó una extracción de sangre venosa para la cuantificación de nucleosomas y dsDNA libre en suero.

4.2.2. Resultados y discusión del segundo estudio

Tras el establecimiento de las cuatro cohortes de comparación (1) controles, (2) SAHS, (3) SCA, (4) SCA+SAHS, se cuantificaron los dos biomarcadores de muerte celular.

Se detectó que las concentraciones séricas de dsDNA y nucleosomas estaban aumentadas en los individuos con SAHS en comparación con los controles sin patología respiratoria del sueño, independientemente de otras posibles variables de confusión, como la edad y el IMC. Además, esas concentraciones eran todavía significativamente superiores en pacientes con SCA, independientemente de la presencia de SAHS, llegando a un valor 3 veces superior en el caso de los nucleosomas y de 2 veces en el caso del dsDNA.

Además, los niveles de nucleosomas correlacionaron positivamente con el índice de apneas-hipopneas (IAH), con el IMC y con la glucemia, a la vez que negativamente con la saturación media y mínima de oxígeno. Por su parte, los niveles de dsDNA también correlacionaron con el IAH, a la vez que con la edad, el colesterol y la presión arterial sistólica. La correlación de ambos biomarcadores con la principal variable relacionada con el SAHS, el IAH, se mantuvo incluso tras ajustar por variables de confusión como edad, género, BMI, colesterol HDL, glucemia, hábito tabáquico y tensión arterial.

Nuestros resultados sugieren que el SAHS podría estar implicado en la elevación de ambos biomarcadores, de forma que éstos podrían reflejar el elevado riesgo cardiovascular que se ha descrito en los individuos con SAHS.

No obstante, cuando tiene lugar un evento coronario, la lisis celular producida por la isquemia cardiaca es el mayor contribuidor a los niveles circulantes de dsDNA o nucleosomas, sobrepasando considerablemente la liberación debida a la hipoxia intermitente inducida por el

SAHS. De esta forma, no parece que el SAHS esté implicado en la elevación de ambos biomarcadores tras un SCA.

ORIGINAL ARTICLE

Cell Death Biomarkers and Obstructive Sleep Apnea: Implications in the Acute Coronary Syndrome

Josep Miquel Bauça^{1,2}; Aina Yañez^{2,3}; Laura Fueyo¹; Mónica de la Peña^{2,4,5}; Javier Pierola²; Alicia Sánchez-de-la-Torre^{5,6}; Olga Mediano^{5,7}; Valentín Cabriada-Nuño⁸; María José Masdeu⁹; Joaquín Teran-Santos^{5,10}; Joaquín Duran-Cantolla^{5,11}; Juan Fernando Masa^{5,12}; Jorge Abad^{5,13}; Manuel Sanchez-de-la-Torre^{5,6}; Ferran Barbé^{5,6}; Antònia Barceló^{1,2,5}; on behalf of the Spanish Sleep Network

¹Department of Laboratory Medicine, Hospital Universitari Son Espases, Palma, Balearic Islands, Spain; ²Institut d'Investigació Sanitària de les Illes Balears (IdISBa), Palma, Balearic Islands, Spain; ³Research Group on Evidence, Lifestyles and Health, Universitat Illes Balears, Palma, Spain; ⁴Respiratory Department, Hospital Universitari Son Espases, Palma, Balearic Islands, Spain; ⁵Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Spain; ⁶Respiratory Department, Institut de Recerca Biomèdica, Lleida, Catalonia, Spain; ⁷Respiratory Department, Hospital Universitario de Guadalajara, Guadalajara, Castilla-La Mancha, Spain; ⁸Respiratory Department, Hospital Universitario Cruces, Bilbao, Basque Country, Spain; ⁹Respiratory Department, Parc Taulí Hospital Universitari, Institut d'Investigació i Innovació Parc Taulí (I3PT), Universitat Autònoma de Barcelona, Sabadell, Catalonia, Spain; ¹⁰Respiratory Department, Hospital Universitario Burgos, Burgos, Castilla-León, Spain; ¹¹Research Department, OSI Araba University Hospital, UPV/EHU, Vitoria, Basque Country, Spain; ¹²Respiratory Department, Hospital San Pedro de Alcántara, Cáceres, Extremadura, Spain; ¹³Respiratory Department, Hospital Germans Trias i Pujol, Barcelona, Catalonia, Spain

Study Objectives: Nucleosomes and cell-free double-stranded DNA (dsDNA) have been suggested as promising biomarkers in cell death-related diseases, such as acute coronary syndrome (ACS). Currently, the impact of obstructive sleep apnea (OSA) in patients with ACS is unclear. Our aim was to evaluate the relationship between OSA, dsDNA, and nucleosomes and to assess their potential implication in the development of ACS.

Methods: Up to 549 patients were included in the study and divided into four groups (145 ACS; 290 ACS + OSA; 62 OSA; 52 controls). All patients underwent a sleep study, and serum concentrations of dsDNA and nucleosomes were measured.

Results: Nucleosome and dsDNA levels were higher in patients with OSA than in controls (nucleosomes: 1.47 ± 0.88 arbitrary units [AU] vs. 1.00 ± 0.33 AU; $p < .001$, dsDNA: 315.6 ± 78.0 ng/mL vs. 282.6 ± 55.4 ng/mL; $p = .007$). In addition, both biomarker levels were higher in patients with ACS than in non-ACS, independently of the presence of OSA.

Conclusions: Both nucleosomes and dsDNA are increased in patients with OSA and might be related with the high cardiovascular risk seen in these patients. The extensive cell lysis during a myocardial infarction seems to be the major contributor to the high biomarker levels, and OSA does not seem to be implicated in such elevation when this acute event occurs.

Clinical trial registration: NCT01335087 (clinicaltrials.gov)

Keywords: nucleosomes, cell-free DNA, cell death biomarkers, cardiovascular risk.

Statement of Significance

Serum nucleosomes and double-stranded DNA are cell components that may be leaked into the bloodstream during cell death. We found increased blood concentrations of both components in patients with obstructive sleep apnea (OSA) and even higher in patients with myocardial infarction.

We suggest that both biomarkers might be related with the high cardiovascular risk seen in patients with OSA. When a myocardial infarction occurs, the extensive cell death in such event is the major contributor to the high levels seen in these patients. Therefore, OSA does not seem to be implicated in cell-free nucleosome or double-stranded DNA elevation after a myocardial infarction.

INTRODUCTION

Obstructive sleep apnea (OSA) syndrome is a multifactorial medical condition where the upper airway dimensions are reduced as a result of both anatomical and functional alterations.^{1,2} During an apnea event (complete airway collapse) or a hypopnea (partial collapse), the airway is narrowed and oxygen saturation is reduced. The intermittent hypoxia could play an essential role in OSA pathophysiological consequences and comorbidities, such as an increased risk of cardiovascular disease and death of any cause.^{3,4} Although OSA has been suggested as an independent risk factor for cardiovascular events, the molecular mechanisms underlying such relationship are not clear to date.^{5,6}

During cell death, intracellular components are leaked into the bloodstream. Therefore, a myriad of biochemical markers is currently detected and quantified in blood for the assessment of human pathologies. Among them, troponin I and troponin T are currently the most specific biomarkers for the diagnosis and follow-up of an acute myocardial infarction (MI).

Particularly during apoptosis, endonucleases are activated and specifically cleave easily accessible sites of chromatin into multiple mononucleosomes and oligonucleosomes.⁷ Nucleosomes are the building blocks of chromatin and consist of octamers of basic proteins (histones) surrounded by double-stranded DNA (dsDNA). When apoptosis, necrosis, or other kinds of cellular senescence occur, both nucleosomes and protein-free DNA are leaked into the circulation.⁸ In physiological conditions, nucleosomes released into the bloodstream are quickly and effectively removed.^{9,10} Therefore, only little amounts can be detected in the serum of a healthy individual. When cell death phenomena are increased, such as in patients with cardiovascular disease, inflammation or cancer, high concentrations of mononucleosomes/oligonucleosomes and cell-free dsDNA may be found.^{11–14} As a result, both may be useful serum biomarkers for the detection of tissue injury, although nonspecific, and might correlate with the extension of the damage.^{15,16}

Emerging bibliography is being published regarding the usefulness of nucleosomes and cell-free DNA in necrosis-related

diseases, such as coronary diseases and cancer,^{13,17} two of the leading causes of morbidity and mortality in the Western societies. Both biomarkers may be regarded as two independent risk factors for atherosclerosis and cardiovascular disease. For instance, dsDNA was suggested to play a role in the pathogenesis of MI¹⁸ and to be a determinant of a prothrombotic state.¹⁹ In fact, it was shown to be more sensitive and peak earlier than cardiac troponin I,¹³ and its concentrations increase proportionately to the complications arising from an acute coronary syndrome (ACS).^{16,20}

Our hypothesis was that OSA generates an increased cardiovascular risk, which translates into increased levels of circulating cell death biomarkers, among others. When an MI takes place, the extensive cell lysis would induce remarkably higher concentrations of nucleosomes and dsDNA in blood than those seen in patients with OSA only. The aims of this study were (1) to assess the interrelationships between OSA and cell death-related biomarkers and (2) to evaluate their potential implication in the development and evolution of an ACS. To this end, serum nucleosomes and dsDNA were measured in four groups: individuals with no previous cardiovascular event (with and without OSA) and patients with ACS (with and without OSA).

MATERIALS AND METHODS

Rationale and Study Design

This study was performed in two branches and included samples from individuals of two different sources: the Sleep Unit of Hospital Universitari Son Espases and the Impact of Sleep Apnea Syndrome in the Evolution of Acute Coronary Syndrome (ISAACC) Study (Figure 1).

In the first part of the study, individuals were recruited only from Hospital Universitari Son Espases and classified either as controls or OSA based on a sleep study. They had all referred to the sleep laboratory for snoring or suspected OSA, and none of them had any history of cardiovascular events.

As statistical differences in cell death biomarkers were seen, an expansion of the study was suggested. Therefore, patients from the ISAACC trial were also included independently and in parallel, before starting continuous positive airway pressure (CPAP) treatment. The ISAACC Study (registered as NCT01335087 on clinicaltrials.gov) is a multicenter, parallel, prospective, randomized control trial that started in April 2011.²¹ Therefore, samples from patients recruited since 2011 (and stored at -80°C) were analyzed after obtaining the results of the initial cohort. The ISAACC trial is evaluating the effects of CPAP treatment on the incidence of new cardiovascular events in patients with an episode of ACS and OSA. These later included patients were from several hospitals in Spain and classified into two groups: either ACS or ACS + OSA.

Participants and Procedures

All patients included in the study provided written, informed consent, and the present it was approved by the Ethics Board of our hospital.

For the initial study, participants underwent a polysomnography (Grael, Compumedics, Australia), and OSA classification was carried out using the apnea-hypopnea index (AHI). Oronasal flow, thoracoabdominal movements, electrocardiogram, and pulse oximetry were recorded. Apnea is defined as an absence of airflow lasting ≥ 10 seconds. Hypopnea is defined

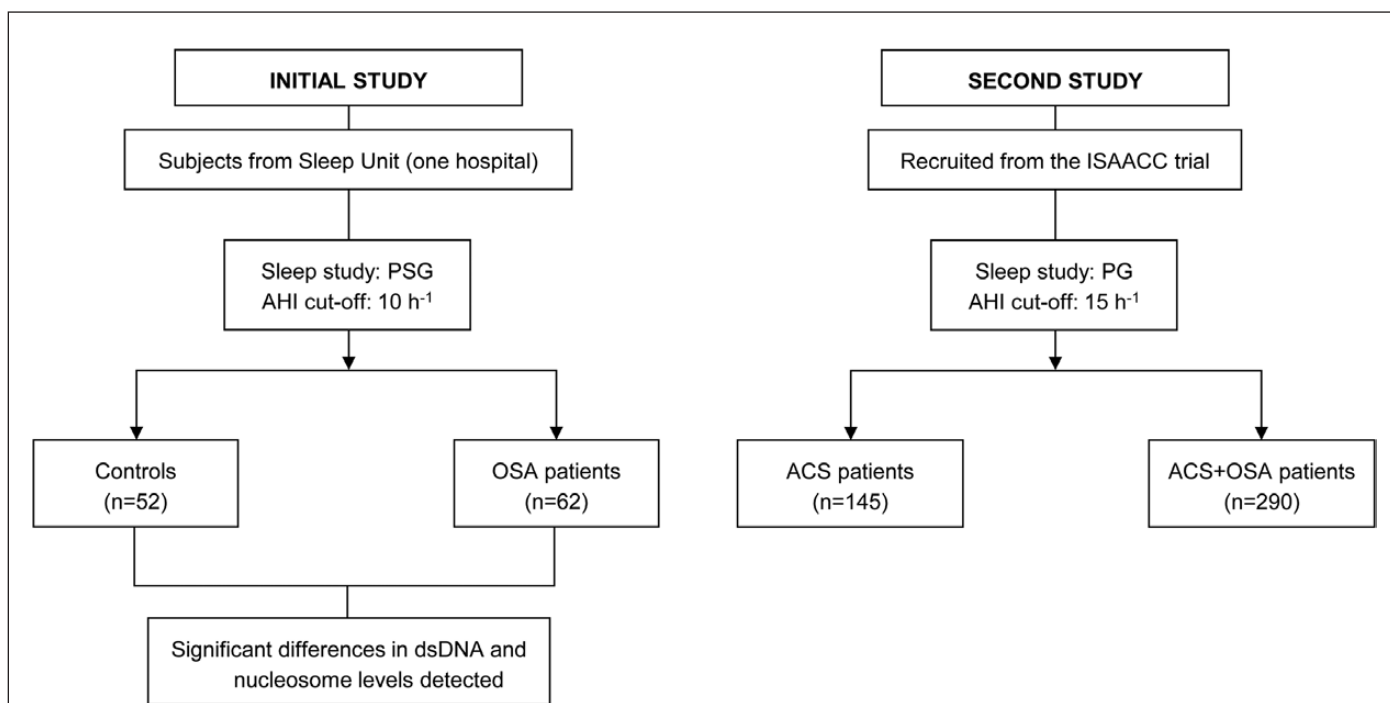


Figure 1—Workflow diagram depicting timeline and participant recruitment. AHI = apnea-hypopnea index; ACS = acute coronary syndrome; dsDNA = double-stranded DNA; ISAACC = Impact of Sleep Apnea Syndrome in the Evolution of Acute Coronary Syndrome; OSA = obstructive sleep apnea syndrome; PG = polygraphy; PSG = polysomnography.

as a discernible reduction (between 30% and 90%) in the width of the respiratory signal lasting more than 10 seconds or an evident reduction in the thoracoabdominal result accompanied by oxygen desaturation ($\geq 3\%$) and/or a microarousal on the electroencephalogram. AHI represents the number of apneas and hypopneas per hour of sleep and was calculated manually by attending physicians. An AHI threshold of 10 h^{-1} was established for the diagnosis of OSA, according to daily clinical practice. The control group was defined by the absence of OSA. The exclusion criteria for this initial study were the following: previous CPAP treatment; psychophysical inability to complete questionnaires; the presence of any previously diagnosed sleep disorder; more than 50% of apneas consisting of central apneas or the presence of Cheyne-Stokes respiration; the presence of daytime sleepiness (Epworth Sleep Scale score > 10); the presence of chronic diseases, including neoplasms, renal insufficiency (glomerular filtration rate $< 15 \text{ mL/min/1.73 m}^2$), severe chronic obstructive pulmonary disease (forced expiratory volume $< 50\%$), chronic depression, and other limiting chronic diseases; a medical history that could interfere with the objectives of the study; and any processes, whether cardiovascular or otherwise, that reduced life expectancy to less than 1 year; and patients in cardiogenic shock.

To avoid possible biases based on the cutoff value selection, further analyses were also performed classifying participants into four different groups, depending on AHI: AHI $< 5 \text{ h}^{-1}$; AHI $5\text{--}10 \text{ h}^{-1}$; AHI $10\text{--}15 \text{ h}^{-1}$; and AHI $> 15 \text{ h}^{-1}$.

For the second study (ISAACC branch), a polygraphic sleep test (Embletta, ResMed, Australia) was performed to every participant, and the diagnosis of OSA was based on the guidelines of the Spanish national consensus on apnea-hypopnea syndrome,²² thus enabling the classification of individuals as either ACS or ACS + OSA (Figure 1, right). According to the previously published ISAACC guidelines,²¹ an AHI threshold of 15 per hour was used for the diagnosis of OSA in this branch. Upon hospital admission, echocardiographic evaluations and Killip classifications were also routinely performed.

Biochemical Analysis

Peripheral blood samples were collected from all participants in the morning after the sleep study, in order to minimize possible diurnal patterning of biomarker release. Serum samples were stored at -80°C until analysis. Blood chemistry analyses (glucose, creatinine, total cholesterol, and high-density lipoprotein [HDL] cholesterol) were performed using commercially available assays (Architect c16000 platform, Abbott Diagnostics). Nucleosome levels were analyzed in serum using the Cell Death Detection ELISA Plus kit (Roche Diagnostics), and results were quantified using the enrichment factor (by comparison with negative pooled sera). The mean of the control group (non-ACS/non-OSA) was normalized to 1 and expressed in arbitrary units (AU). Levels of dsDNA were quantified in duplicate in serum using the Quant-iT™ Picogreen® dsDNA kit (Invitrogen), following manufacturer's instructions. Coefficients of variation were 9% for nucleosomes (in-house checked, data not shown) and 2.7% for dsDNA (stated by manufacturer).

Data Analysis

All data (demographical, polygraphic, and biochemical) were included in a database. The mean values (standard deviations)

or frequencies (and percentages) were compared between the control group and the OSA group (initial study) and between the two ACS groups (with and without OSA). Differences were evaluated using Mann-Whitney tests (or Student *t* tests, if normally distributed), or chi-squared tests. When patients were classified into more than two groups, analyses of variance were performed. The associations between nucleosomes, dsDNA, and other variables were assessed using a linear regression models, as appropriate. Additionally, the models were adjusted for age, gender, body mass index (BMI), HDL cholesterol, systolic blood pressure, smoking status, and glucose levels.

The SPSS v19 software (IBM Corporation, New York) was used for all statistical analyses, and significance was set at 0.05.

RESULTS

A total of 549 individuals were finally included and divided into: participants with no previous cardiovascular event (52 with OSA and 62 without OSA) and participants with ACS (290 with OSA and 145 without OSA). The clinical characteristics of the participants are outlined in Table 1 (initial study) and Table 2 (second study). In the non-ACS group, patients with OSA were significantly older, had higher BMI, higher glucose levels and systolic blood pressure, and smoking was more prevalent.

Nucleosome levels were higher in patients with OSA compared with controls ($1.47 \pm 0.88 \text{ AU}$ vs. $1.00 \pm 0.33 \text{ AU}$; $p < .001$). Such nucleosome levels correlated positively with AHI ($r = +0.562$, $p < .001$), BMI ($r = +0.360$, $p < .001$), and glucose levels ($r = +0.217$, $p = .026$) and negatively with both mean and minimum oxygen saturation ($r = -0.396$, $p < .001$ and $r = -0.438$, $p < .001$, respectively). No significant correlation was obtained between nucleosome levels and age, total cholesterol, HDL cholesterol, and blood pressure. In a linear regression analysis, after adjusting for potential confounding variables (age, gender, BMI, HDL cholesterol, systolic blood pressure, and glycemia), nucleosome levels were associated with AHI ($p < .001$), whereas no association with any other assessed variable was detected (BMI, glucose, cholesterol, blood pressure) (Figure 2A).

dsDNA levels were also higher in patients with OSA compared with controls (315.6 ± 78.0 vs. $282.6 \pm 55.4 \text{ ng/mL}$; $p = .007$). dsDNA concentration also correlated with AHI ($r = +0.267$, $p = .004$), although the strength of correlation was lower than for nucleosomes. Also with age ($r = +0.303$, $p = .001$), total cholesterol ($r = +0.270$, $p = .005$), HDL cholesterol ($r = +0.287$, $p = .003$), and systolic blood pressure ($r = +0.282$, $p = .003$). No correlation was seen with other variables such as glucose levels, mean or minimum oxygen saturation ($p = .157$ and $p = .125$, respectively), or BMI ($p = .317$). Moreover, after adjusting for age, gender, BMI, HDL cholesterol, glucose levels, smoking status, and blood pressure (even some of them not significant in single variate analyses), either dsDNA and nucleosome levels still significantly correlated with AHI ($p = .049$ and $p < .001$, respectively) (Table 3). Of all variables included in the analysis, AHI is the one that most explains both nucleosome and dsDNA concentration variation (Table 3).

When considering the whole non-ACS cohort and dividing participants into four groups based on AHI ($< 5 \text{ h}^{-1}$; $5\text{--}10 \text{ h}^{-1}$;

Table 1—Demographic Data of Patients Without ACS (Initial Study).

Parameter	Controls (n = 52)	OSA (n = 62)	p value
Age, years	46.0 ± 14.8	54.0 ± 13.1	.003*
Male, %	24 (46.2%)	39 (62.9%)	.073
BMI, kg·m ⁻²	27.1 ± 5.3	31.6 ± 8.2	.001*
Glucose, mg/dL	93.5 ± 23.4	105.8 ± 22.7	.008
Total cholesterol, mg/dL	190.8 ± 38.5	198.5 ± 41.8	.337
HDL cholesterol, mg/dL	58.6 ± 25.6	56.2 ± 33.1	.691
Systolic pressure, mm Hg	120.6 ± 18.2	128.0 ± 16.7	.033*
Diastolic pressure, mm Hg	71.9 ± 12.0	74.5 ± 12.1	.282
AHI, h ⁻¹	5.5 ± 2.7	40.5 ± 22.8	<.001*
Smoking status, %			.017*
-No	23 (51.1%)	19 (34.5%)	
-Yes	15 (33.3%)	13 (23.6%)	
-Former smoker	7 (15.6%)	23 (41.8%)	
Mean O ₂ saturation, %	95.3 ± 2.3	91.8 ± 4.1	<.001*
Medications, %			<.001*
-ACE inhibitors	0	8 (13%)	
-Platelet antiaggregants	1 (1.9%)	1 (1.6%)	
-Insulin	0	1 (1.6%)	
-Diuretics	1 (1.9%)	4 (6.4%)	
-Anticoagulants	0	1 (1.6%)	
-Oral antidiabetics	1 (1.9%)	3 (4.8%)	
-Calcium antagonists	1 (1.9%)	0	
-Bronchodilators	1 (1.9%)	10 (16%)	
-Hypolipidemic agents	2 (3.8%)	10 (16%)	
-Beta-blockers	0	3 (4.8%)	
-Antacids	2 (3.8%)	3 (4.8%)	
-Psychotropic drugs	1 (1.9%)	2 (3.2%)	
-Other	10 (19%)	8 (13%)	
dsDNA, ng/mL	282.6 ± 48.3	310.5 ± 58.3	.007*
Nucleosomes, AU	1.00 ± 0.31	1.67 ± 0.27	<.001*

*Significant at $p < .05$ level.

ACE = angiotensin converting enzyme; ACS = acute coronary syndrome; AHI = apnea-hypopnea index; AU = arbitrary units; BMI = body mass index; dsDNA = double-stranded DNA; OSA = obstructive sleep apnea.

10–15 h⁻¹, and >15 h⁻¹), statistical significance remained among groups ($p < .001$ for nucleosomes; $p = .017$ for dsDNA), thus suggesting that the AHI cutoff value selection has no impact on our findings (Figure 3).

In patients with ACS (Table 2), OSA was detected in 67% of cases. The patients with OSA were older and with higher BMIs. No differences in OSA prevalence were detected between genders. Nucleosome and dsDNA levels were increased compared with non-ACS patients (for nucleosomes: 3.46 ± 4.33 AU vs. 1.14 ± 0.37 AU; $p < .001$ and for dsDNA:

556.9 ± 167.8 ng/mL vs. 297.9 ± 55.2 ng/mL; $p < .001$). However, no differences were obtained between patients with and without OSA (for nucleosomes: 3.81 ± 1.44 AU vs. 3.23 ± 2.02 AU; $p = .101$ and for dsDNA: 539.6 ± 146.4 ng/mL vs. 565.9 ± 177.5 ng/mL; $p = .120$), either adjusting for age and BMI or not (Figure 2). Differences in this cohort were neither seen when individuals were classified in four AHI groups (<5 h⁻¹; 5–10 h⁻¹; 10–15 h⁻¹, and >15 h⁻¹): $p = .324$ for nucleosome concentration and $p = .132$ for dsDNA.

Table 2—Demographic Data of Patients With ACS (Secondary Study; ISAACC Branch).

Parameter	ACS (n = 145)	ACS + OSA (n = 290)	p value
Age	56.6 ± 11.2	60.1 ± 10.8	.659
Male, %	121 (83.4%)	229 (81.2%)	.568
BMI, kg·m ⁻²	27.0 ± 4.5	28.9 ± 4.5	.660
Glucose, mg/dL	116.9 ± 47.0	128.6 ± 62.3	.015*
Total cholesterol, mg/dL	179.5 ± 43.3	180.5 ± 46.0	.847
HDL cholesterol, mg/dL	45.1 ± 36.8	41.5 ± 19.2	.059
Systolic pressure, mm Hg	120.7 ± 16.9	125.3 ± 18.5	.295
Diastolic pressure, mm Hg	72.6 ± 10.6	73.1 ± 11.5	.620
AHI, h ⁻¹	4.2 ± 2.6	31.9 ± 18.3	.001*
Smoking status, %			.191
-No	33 (23.2%)	88 (31.7%)	
-Yes	69 (48.6%)	123 (44.2%)	
-Former smoker	40 (28.2%)	67 (24.1%)	
Mean O ₂ saturation, %	92.4 ± 11.3	92.6 ± 5.4	.843
dsDNA, ng/mL	555.6 ± 161.1	558.7 ± 175.2	.851
Nucleosomes, AU	3.81 ± 1.44	3.23 ± 2.02	.203

*Significant at $p < .05$ level.

ACS = acute coronary syndrome; AHI = apnea-hypopnea index; AU = arbitrary units; BMI = body mass index; dsDNA = double-stranded DNA; ISAACC = Impact of Sleep Apnea Syndrome in the Evolution of Acute Coronary Syndrome; OSA = obstructive sleep apnea.

DISCUSSION

The results of our study show that nucleosomes and dsDNA in serum are increased in patients with OSA in comparison with participants without OSA. An increase in both cell death biomarkers was also detected in ACS patients compared with patients without any cardiovascular event, independently of the presence of OSA. The present findings suggest that: (1) OSA may be implicated in the increased levels of the two cell death-related biomarkers; (2) the extensive cell lysis resulting from an MI appears to be the major contributor to the high levels of both biomarkers detected in patients after an ACS; (3) OSA does not seem to contribute to such elevation when this acute event occurs.

OSA and Cell Death Biomarkers

Although OSA-independent elevations were detected in patients with ACS, significant increases were seen for dsDNA and nucleosomes in OSA patients without coronary disease. Despite using different quantification methods and sample types, our findings are consistent with a previous case-control study by Shin et al.,²³ where high cell-free DNA concentrations correlated with a higher OSA prevalence in patients without

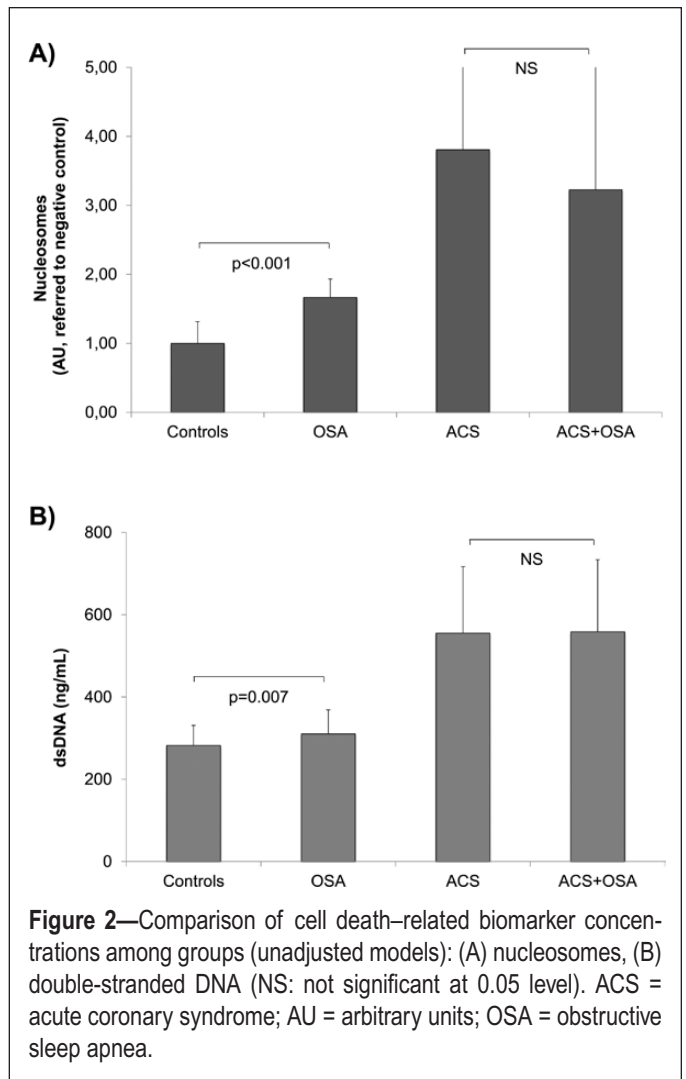


Figure 2—Comparison of cell death-related biomarker concentrations among groups (unadjusted models): (A) nucleosomes, (B) double-stranded DNA (NS: not significant at 0.05 level). ACS = acute coronary syndrome; AU = arbitrary units; OSA = obstructive sleep apnea.

coronary disease. The previous publication reported an association between AHI and dsDNA concentration on a multivariate analysis, and we further confirmed such relationship by performing a linear correlation analysis and showing a positive and significant association between AHI and both nucleosomes and dsDNA.

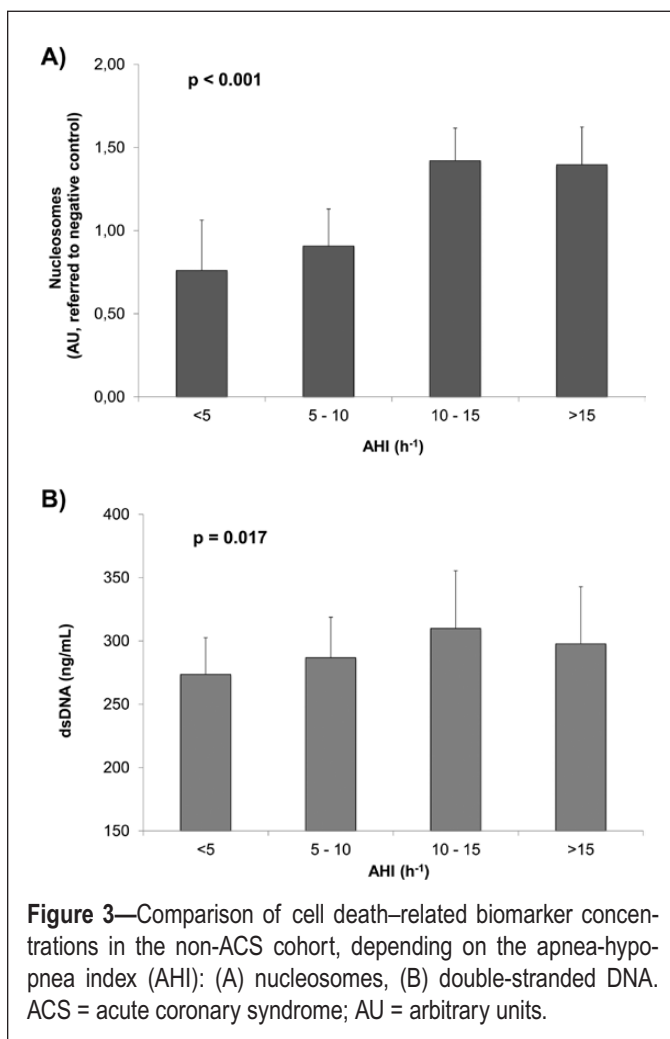
Nucleosomes and ACS

To our knowledge, only one study has previously assessed the serum concentration of nucleosomes in patients with MI.¹⁹ In this report, nucleosome high baseline studies were described to show an odds ratio of 2.59 for the prediction of major adverse cardiac events. This observation further supports our hypothesis that extensive cell death occurs after a cardiovascular event. Intracellular components appear to be massively leaked in the bloodstream in ACS patients, whereas neither liver metabolism nor immune-mediated clearance can effectively remove them. However, because several other critical conditions have also shown to increase cell-free DNA levels, such as infection, cancer, and respiratory insufficiency,²⁴ the release of such biomarkers might result from an inflammatory state,²⁵ which is greatly increased in MI. In our study, in spite of different recruitment and AHI thresholds, an almost fourfold increase

Table 3—Multiple Regression Analyses for the Groups Without ACS, Having Nucleosomes and dsDNA as Dependent Variables, Respectively.

Parameter	Nucleosomes			dsDNA		
	β	p value	η_p^2	β	p value	η_p^2
BMI	0.003	.120	0.028	-8.665	.296	0.013
HDL cholesterol	<0.001	.219	0.017	6.657	.001	0.120
Age	-0.001	.286	0.013	4.618	.262	0.015
Systolic blood pressure	-0.001	.138	0.025	5.264	.115	0.029
AHI	0.003	<.001	0.246	5.719	.049	0.044
Glucose	0.001	.227	0.017	2.408	.298	0.013
Smoking status	0.018	.459	0.007	77.14	.533	0.005

AHI = apnea-hypopnea index; ACS = acute coronary syndrome ; BMI = body mass index; dsDNA = double-stranded DNA; η_p^2 = partial eta squared.



in nucleosome levels was detected after an ACS for patients without OSA. In addition, a twofold increase was seen after a cardiovascular event for patients with OSA. These results are concordant with the twofold increase seen in patients with deep vein thrombosis,¹² the 2.4-fold increase in patients with severe coronary atherosclerosis¹⁹ and the 2.56-fold increase in patients with heart failure.²⁶

By contrast, observations published elsewhere described a cardioprotective role for OSA in the acute phase of a myocardial ischemic injury.^{27,28} Shah et al. found lower blood troponin T levels after an MI in individuals with more severe OSA compared with those without OSA, thus suggesting a possible adaptation situation in patients with sleep apnea. In this sense, further studies are needed to clarify the possible ischemic preconditioning behavior of OSA and its scope after a nonfatal cardiac event.

Serum dsDNA and MI

Although alternative dsDNA quantification methods were used in literature, our observations in patients with ACS are consistent with previous studies assessing free DNA concentrations in serum or plasma samples. Using a bDNA-based Alu assay, two different studies obtained a 45-fold increase²³ and a 19-fold increase¹⁶ in MI patients, respectively, whereas another quantitative polymerase chain reaction study yielded a twofold increase of nuclear DNA concentrations in ACS patients on hospital day 1 compared to a non-MI control group.²⁰ A study performed using our same methodology stated that patients after ACS had a 10-fold increase in cell-free DNA compared to healthy controls.¹⁷ Compared to our results, where a twofold increase was observed in ACS patients compared to the control group, the differences in the degree of the increase (10-fold vs. 2-fold) are most probably due to the selection of the control group, as the dsDNA values in the ACS groups are similar between studies (510.6 ± 398.0 ng/mL in Chang et al.¹⁷ vs. 556.9 ± 167.8 ng/mL in our study). The gradual increase in dsDNA concentrations, as well as in nucleosomes, further corroborates the above-mentioned hypothesis and underlines OSA as an independent contributor to the high biomarker levels, possibly related with the high cardiovascular risk seen in patients with OSA. Nevertheless, the high concentrations of both biomarkers seen after an ACS could derive from an extensive cell lysis resulting from an MI, regardless of the presence of OSA. These observations were independent of the AHI cutoff value election.

The results of the present study also contribute to the possibility that OSA might be a risk determinant for atherosclerosis and help in the understanding of the pathophysiological mechanisms of ACS. Well-established relationships between

cell death biomarkers and vascular diseases have already been published elsewhere, including dsDNA elevations in acute ischemic stroke.²⁹ However, a recent trial including patients with a history of coronary artery disease or cardiovascular disease and OSA showed that the use of CPAP would not reduce the rate of MI, stroke, heart failure, or death from cardiovascular causes.³ Nevertheless, the link between sleep-breathing disorders and cardiovascular disease might be further elucidated as the ISAACC trial moves forward.

Multiple hypotheses link increased extracellular DNA concentrations with the initiation or exacerbation of atherosclerosis, acting as a link between innate and adaptive immune responses.²⁹ Our results suggest that these mechanisms might be exacerbated and play an important role in the high cardiovascular risk observed in patients with OSA. Moreover, circulating dsDNA, nucleosomes, and even myeloperoxidase-DNA complexes have been reported to be associated an increased cardiovascular risk.^{19,30,31} Although their role in the pathogenesis is still unclear,^{32,33} all three biomarkers were suggested as independent determinants of a prothrombotic state, as robust correlations were obtained with well-established prothrombotic biomarkers, such as thrombin-antithrombin complexes and von Willebrand factor levels.³⁴

This study has several limitations. First, during patient recruitment, those with daytime sleepiness were excluded from the study, which were the patients with most severe OSA. Moreover, in ACS patients, OSA was diagnosed based on a respiratory polygraphy, which is claimed to sometimes underestimate the severity of the disease. Second, a higher number of controls would have raised the power of the observations. Third, the analytical conditions of the measurements: the high variability of serum nucleosome quantification may limit its usefulness as biomarker and hamper the conclusions drawn thereof, as well as the lack of robust information regarding the dependence of dsDNA or nucleosomes with other preanalytical variables, such as age, gender, ongoing medications, diabetes, or dyslipidemia. In addition, the intrascorer and interscorer variation could add some variability in the interpretation of the sleep studies. Furthermore, additional studies assessing short- and long-term issues are yet to be performed for a better evaluation of the role of cell death in the whole pathophysiological process.

CONCLUSIONS

Differential nucleosome and dsDNA levels among controls, patients with OSA without cardiovascular disease and patient with ACS bring to light potential implications of these cell death biomarkers in the pathological mechanisms of atherosclerosis and the development of coronary events. Our observations reveal that the two cell death-related biomarkers may play an important role in the high cardiovascular risk seen in patients with OSA. The high levels of both biomarkers detected in patients after an ACS could derive from an extensive cell death resulting from an MI, independently of the presence of OSA.

Additional studies evaluating cardiovascular event outcomes are warranted, for a better assessment of the actual impact of nucleosomes and dsDNA in the cardiovascular disease and the underlying molecular mechanisms.

JM. Bauça Rosselló

SLEEP Vol. XX, No. X, 2017

Downloaded from <https://academic.oup.com/sleep/article-abstract/40/5/zsx049/3737643>
by Hospital vall d'Hebron user
on 24 November 2017

REFERENCES

- Lévy P, Kohler M, McNicholas WT, et al. Obstructive sleep apnoea syndrome. *Nat Rev Dis Primers*. 2015; 1: 15015.
- De Luca Canto G, Pachêco-Pereira C, Aydinov S, Major PW, Flores-Mir C, Gozal D. Biomarkers associated with obstructive sleep apnea and morbidities: a scoping review. *Sleep Med*. 2015; 16(3): 347–357.
- McEvoy RD, Antic NA, Heeley E, et al.; SAVE Investigators and Coordinators. CPAP for prevention of cardiovascular events in obstructive sleep apnea. *N Engl J Med*. 2016; 375(10): 919–931.
- Sánchez-de-la-Torre M, Campos-Rodríguez F, Barbé F. Obstructive sleep apnoea and cardiovascular disease. *Lancet Respir Med*. 2013; 1(1):61–72.
- Barbé F, Sánchez-de-la-Torre A, Abad J, et al.; Spanish Sleep Network. Effect of obstructive sleep apnoea on severity and short-term prognosis of acute coronary syndrome. *Eur Respir J*. 2015; 45(2): 419–427.
- Barcelo A, Bauça JM, Yañez A, et al.; Spanish Sleep Group. Impact of obstructive sleep apnea on the levels of placental growth factor (PLGF) and their value for predicting short-term adverse outcomes in patients with acute coronary syndrome. *PLoS One*. 2016; 11(3): e0147686.
- Holdenrieder S, Stieber P, Bodenmüller H, et al. Nucleosomes in serum as a marker for cell death. *Clin Chem Lab Med*. 2001; 39(7): 596–605.
- Fuchs TA, Brill A, Wagner DD. Neutrophil extracellular trap (NET) impact on deep vein thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012; 32(8): 1777–1783.
- Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol*. 1980; 68: 251–306.
- Holdenrieder S, Stieber P, Liska V, et al. Cytokeratin serum biomarkers in patients with colorectal cancer. *Anticancer Res*. 2012; 32(5): 1971–1976.
- Holdenrieder S, Burges A, Reich O, Spelsberg FW, Stieber P. DNA integrity in plasma and serum of patients with malignant and benign diseases. *Ann N Y Acad Sci*. 2008; 1137: 162–170.
- van Montfoort ML, Stephan F, Lauw MN, et al. Circulating nucleosomes and neutrophil activation as risk factors for deep vein thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013; 33(1): 147–151.
- Jing RR, Wang HM, Cui M, et al. A sensitive method to quantify human cell-free circulating DNA in blood: relevance to myocardial infarction screening. *Clin Biochem*. 2011; 44(13): 1074–1079.
- Pathak AK, Bhutani M, Kumar S, Mohan A, Guleria R. Circulating cell-free DNA in plasma/serum of lung cancer patients as a potential screening and prognostic tool. *Clin Chem*. 2006; 52(10): 1833–1842.
- Shapiro B, Chakrabarty M, Cohn EM, Leon SA. Determination of circulating DNA levels in patients with benign or malignant gastrointestinal disease. *Cancer*. 1983; 51(11): 2116–2120.
- Cui M, Jing R, Fan M, Zhu J, Ju S. The relationship between cell-free circulating DNA and inflammation in acute coronary syndrome. *Cardiology*. 2013; 126(2): 124–125.
- Chang CP, Chia RH, Wu TL, Tsao KC, Sun CF, Wu JT. Elevated cell-free serum DNA detected in patients with myocardial infarction. *Clin Chim Acta*. 2003; 327(1-2): 95–101.
- Kawai Y, Yoshida M, Arakawa K, et al. Diagnostic use of serum deoxyribonuclease I activity as a novel early-phase marker in acute myocardial infarction. *Circulation*. 2004; 109(20): 2398–2400.
- Borissoff JJ, Joosen IA, Versteijlen MO, et al. Elevated levels of circulating DNA and chromatin are independently associated with severe coronary atherosclerosis and a prothrombotic state. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013; 33(8): 2032–2040.
- Wang L, Xie L, Zhang Q, et al. Plasma nuclear and mitochondrial DNA levels in acute myocardial infarction patients. *Coron Artery Dis*. 2015; 26(4): 296–300.
- Esquinas C, Sánchez-de-la Torre M, Aldomá A, et al.; Spanish Sleep Network. Rationale and methodology of the impact of continuous positive airway pressure on patients with ACS and nonsleepy OSA: the ISAACC Trial. *Clin Cardiol*. 2013; 36(9): 495–501.
- Spanish National Consensus. Sleep apnea-hypopnea syndrome (SAHS) [article in Spanish]. *Arch Bronconeumol*. 2005; 41 Suppl 4:7–9.
- Shin C, Kim JK, Kim JH, et al. Increased cell-free DNA concentrations in patients with obstructive sleep apnea. *Psychiatry Clin Neurosci*. 2008; 62(6): 721–727.
- Butt AN, Swaminathan R. Overview of circulating nucleic acids in plasma/serum. *Ann N Y Acad Sci*. 2008; 1137: 236–242.

25. Jiang N, Pisetsky DS. The effect of inflammation on the generation of plasma DNA from dead and dying cells in the peritoneum. *J Leukoc Biol.* 2005; 77(3): 296–302.
26. Nymo SH, Ueland T, Askevold E, et al. Circulating nucleosomes in chronic heart failure. *Int J Cardiol.* 2016; 203: 742–743.
27. Shah N, Redline S, Yaggi HK, et al. Obstructive sleep apnea and acute myocardial infarction severity: ischemic preconditioning? *Sleep Breath.* 2013; 17(2): 819–826.
28. Querejeta Roca G, Redline S, Punjabi N, et al. Sleep apnea is associated with subclinical myocardial injury in the community. The ARIC-SHHS study. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013; 188(12): 1460–1465.
29. Döring Y, Manthey HD, Drechsler M, et al. Auto-antigenic protein-DNA complexes stimulate plasmacytoid dendritic cells to promote atherosclerosis. *Circulation.* 2012; 125(13): 1673–1683.
30. Mahmoudi M, Mercer J, Bennett M. DNA damage and repair in atherosclerosis. *Cardiovasc Res.* 2006; 71(2): 259–268.
31. Tsai NW, Lin TK, Chen SD, et al. The value of serial plasma nuclear and mitochondrial DNA levels in patients with acute ischemic stroke. *Clin Chim Acta.* 2011; 412(5-6): 476–479.
32. Zeerleder S, Stephan F, Emonts M, et al. Circulating nucleosomes and severity of illness in children suffering from meningococcal sepsis treated with protein C. *Crit Care Med.* 2012; 40(12): 3224–3229.
33. Borissoff JJ, ten Cate H. From neutrophil extracellular traps release to thrombosis: an overshooting host-defense mechanism? *J Thromb Haemost.* 2011; 9(9): 1791–1794.
34. Lowe G. Can haemostatic factors predict atherothrombosis? *Intern Emerg Med.* 2011; 6(6): 497–501.

SUBMISSION & CORRESPONDENCE INFORMATION

Submitted for publication December, 2016

Submitted in final revised form February, 2017

Accepted for publication April, 2017

Address correspondence to: Josep Miquel Bauça, Ctra. de Valldemossa, 79, module J-0, 07120 Palma, Balearic Islands, Spain. Telephone: 0034 871205876; Fax: 0034 871205050; Email: pepmiquel@gmail.com

DISCLOSURE STATEMENT

FB received a research grant from the following organizations to develop the ISAACC clinical trial (NCT01335087): ResMed Inc, Australia; the Health Research Fund of the Spanish Ministry of Health; the Spanish Respiratory Society (SEPAR); the Catalan Cardiology Society; Esteve-Teijin, Spain; Oxigen Salud, Spain; and ALLER. All other authors declare that they have no conflicts of interest.

4.3. Tercer estudio

Bauça JM, Barcelo A, Fueyo L, Sanchis P, Pierola J, de la Peña M, *et al.* Biomarker panel in sleep apnea patients after a coronary event [en revisión]

4.3.1. Presentación del tercer estudio

El síndrome de apneas-hipopneas del sueño (SAHS) está considerado un factor de riesgo cardiovascular independiente. Los eventos de hipoxia intermitente conducen al desarrollo de comorbilidades asociadas con el SAHS, destacando las cardiovasculares, cerebrovasculares y neurocognitivas. Este fenómeno se podría explicar debido a los complejos mecanismos fisiopatológicos del SAHS, incluyendo el estrés oxidativo, disfunción metabólica, inflamación sistémica y activación inmune, así como la activación del sistema nervioso simpático y la disfunción endotelial. En pacientes tras un síndrome coronario agudo (SCA), la detección temprana de SAHS podría ayudar y mejorar su manejo clínico.

En este tercer estudio, nuestros objetivos eran, mediante la cuantificación de biomarcadores sanguíneos relacionados con los diferentes aspectos fisiopatológicos del SAHS, evaluar el impacto de esta patología en la utilidad de estos biomarcadores en la predicción de la gravedad del SCA, así como comprobar si estos biomarcadores (individualmente o combinados) permitirían detectar la presencia de SAHS en pacientes tras un evento coronario.

Para ello, se incluyeron 361 individuos tras un síndrome coronario agudo, que se clasificaron en SAHS y no SAHS. Se registraron las variables antropométricas de interés y se evaluó la gravedad del SCA (Killip, número de vasos afectados y fracción de eyección). A la mañana siguiente, se realizó una extracción de sangre venosa para la cuantificación de once biomarcadores relacionados con los aspectos fisiopatológicos del SAHS.

4.3.2. Resultados y discusión del tercer estudio

Se detectó que varios biomarcadores estaban relacionados con la gravedad del SCA, y la significación estadística se mantenía tras ajustar por la presencia de SAHS así como otras variables de confusión, como edad, género, índice de masa corporal (IMC), hábito tabáquico, hábito alcohólico, diabetes o hipertensión.

Cuando se analizan por separado las tres variables relacionadas con la gravedad del SCA, y tras ajustar por variables de confusión, destacó que los biomarcadores asociados con una puntuación de Killip elevada fueron la PCR ultrasensible y el PIGF, aquellos asociados con una fracción de eyección disminuida fueron Nt-proBNP y la albúmina, mientras que para un elevado número de vasos afectados fueron la MMP9 y la insulina.

Por otra parte, se detectó que había varios biomarcadores con valores estadísticamente diferentes entre la población SCA y SCA+SAHS, entre los que destacan insulina y PIGF, para los que se encontró un área bajo la curva ROC (*receiver operating characteristics*) de 0,573 y 0,584, respectivamente. Incluso se calcularon las proporciones de riesgo (*odds ratio*) para el diagnóstico de SAHS de cada uno de ellos.

Esperando maximizar el poder de discriminación de estos biomarcadores para la detección de SAHS en esta cohorte de pacientes tras un evento coronario, se propusieron varias combinaciones matemáticas que incluían variables antropométricas (edad, IMC, tensión arterial...) con biomarcadores y se calculó el área bajo la curva ROC para cada una de ellas. Así se vio que la combinación en un algoritmo de cuatro parámetros: edad, IMC, factor de crecimiento placentario (PIGF) y metaloproteinasa de la matriz 9 (MMP9) presentaba el mayor poder de detección de SAHS. La inclusión de parámetros adicionales en ese algoritmo (p.ej. insulina, sFlt1, hsPCR) no era capaz de mejorar el poder de detección.

Así, con los resultados obtenidos en nuestro estudio parece que la utilidad de estos biomarcadores de riesgo cardiovascular para predecir la gravedad del SCA es independiente de SAHS y de las otras variables estudiadas. En pacientes tras un SCA, la

combinación de parámetros antropométricos con biomarcadores tiene el mayor poder de discriminación para la detección de SAHS.

BIOMARKER PANEL IN SLEEP APNEA PATIENTS

AFTER A CORONARY EVENT

Authors:

Josep Miquel Bauça^{1,2,*}, Antonia Barcelo^{1,2,3}, Laura Fueyo¹, Pilar Sanchís², Javier Pierola², Mónica de la Peña^{3,4}, Meritxell Arqué¹, Cristina Gómez¹, Daniel Morell-Garcia^{1,2}, Alicia Sánchez-de-la-Torre^{3,5}, Manuel Sánchez-de-la-Torre^{3,5}, Jorge Abad⁶, Joaquín Duran-Cantolla⁷, Olga Mediano^{3,8}, Maria José Masdeu⁹, Amaia Urrutia-Gajate¹⁰, Joaquín Teran-Santos^{3,11}, Juan Fernando Masa¹², Ferran Barbé^{3,5}, on behalf of the Spanish Sleep Group.

Affiliations:

¹ Department of Laboratory Medicine, Hospital Universitari Son Espases, Palma, Balearic Islands, Spain.

² Institut d'Investigació Sanitària de les Illes Balears (IdISBa), Balearic Islands, Spain.

³ Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Madrid, Spain.

⁴ Respiratory Department, Hospital Universitari Son Espases, Palma, Balearic Islands, Spain.

⁵ Respiratory Department, Group of Translational Research in Respiratory Medicine, Hospital Universitari Arnau de Vilanova and Santa Maria. IRB Lleida. Lleida, Catalonia, Spain.

⁶ Respiratory Department, Hospital Germans Trias i Pujol, Barcelona, Catalonia, Spain.

⁷ Respiratory Department, OSI Araba University Hospital. UPV/EHU. Vitoria, Basque Country, Spain.

⁸ Respiratory Department, Hospital Universitario de Guadalajara, Guadalajara, Castilla-La Mancha, Spain.

⁹ Respiratory Department. Parc Taulí Hospital Universitari. Institut d'Investigació i Innovació Parc Taulí (I3PT). Universitat Autònoma de Barcelona. Sabadell, Catalonia, Spain.

¹⁰ Respiratory Department, Hospital Universitario Cruces, Bilbao, Spain.

¹¹ Respiratory Department, Hospital Universitario Burgos, Burgos, Castilla-León, Spain.

¹² Respiratory Department, Hospital San Pedro de Alcántara, Cáceres, Extremadura, Spain

*Address for correspondence:

Josep Miquel Bauça

Department of Laboratory Medicine, Hospital Universitari Son Espases

Ctra. de Valldemossa, 79, module J-0

07010 Palma, Balearic Islands, Spain

Email address: pepmiquel@gmail.com

Running title: Biomarkers for sleep apnea

Manuscript word count	2449
Abstract word count	269
Tables	3 + 1(Suppl)
Figures	1
References	37

Author contributions:

Conceived and designed the experiments (AB, FB), collected samples/reagents (MP, AS, MS, JA, JD, OM, MJM, AU, JT), performed the experiments (JMB, LF, JP, MA), analyzed the data (JMB, PS, AB), wrote the manuscript (JMB, AB, AS, MS), guarantor of the study (FB).

Conflict of Interest disclosures:

FB received a research grant from the following organizations to develop the ISAACC clinical trial (NCT01335087): ResMed Ltd, Australia; the Health Research Fund of the Spanish Ministry of Health (PI10/02763 and PI10/02745); the Spanish Respiratory Society (SEPAR); the Catalanian Cardiology Society; Esteve-Teijin, Spain; Oxigen Salud, Spain; and ALLER. All other authors declare that they have no conflicts of interest.

No sponsor did play any role in the design of the experiments, analysis, interpretation of data, writing or decision to submit it for publication.

ABSTRACT

Background:

Acute coronary syndrome (ACS) is a major cause of death and closely related with obstructive sleep apnea (OSA). Our hypothesis is that several cardiovascular-related biomarkers could have a differential prognostic value for ACS severity in patients with OSA, and could also help (individually or combined) in the detection of OSA in patients after a coronary event.

Methods:

Up to 361 consecutive individuals admitted due to ACS were included in the study. All of them were evaluated for ACS severity (Killip score, number of diseased vessels, ejection fraction) and further classified as OSA or non-OSA. Medical records were registered and eleven blood biomarkers were measured, including heart-type fatty acid-binding globulin, N-terminal pro-brain natriuretic peptide, matrix metalloproteinase-9 (MMP9), placental growth factor (PIGF) and high-sensitivity C-reactive protein.

Odds ratios of every biomarker for ACS severity-related parameters were calculated and adjusted for age, gender, body-mass index (BMI), hypertension, diabetes, smoking and drinking. The use of clinical measures and biomarkers for the diagnosis of OSA in ACS patients was evaluated both alone and combined using ROC curves.

Results:

Several biomarkers showed a significant association with ACS severity, which remained after adjusting for OSA and other potentially confounding variables.

The mathematical combination of age, BMI, PIGF and MMP9 showed an area under the ROC curve (AUC) for OSA identification of 0.741, which was greater than any individual parameter assessed: AUC(BMI):0.687, AUC(age):0.576, AUC(PIGF):0.584, AUC(MMP9):0.555.

Conclusions:

The usefulness of biomarkers in the assessment of ACS severity was independent of OSA and the other variables evaluated. In patients admitted after a coronary event, the combination of clinical measures and biomarkers showed a significant discriminating power for the detection of OSA.

Clinical trial registration: NCT01335087 (clinicaltrials.gov)

Keywords: diagnostic algorithm, angiogenesis, cardiovascular risk, myocardial infarction

INTRODUCTION

Coronary artery disease has become the leading cause of death worldwide. Its main manifestation is the acute coronary syndrome (ACS), whose symptoms are due to an insufficient oxygen supply to the cardiac muscle caused by an obstruction in the coronary vessels^{1,2}. A myriad of cardiovascular risk factors have been described and helped in the understanding of the pathophysiology of ACS, as well as in its prediction and characterization.

Obstructive sleep apnea (OSA), a very prevalent respiratory disease, stands out as one of the main modifiable cardiovascular risk factors^{3,4}. It results from a narrowing in the upper airway during sleep, which causes a reduction in the oxyhemoglobin saturation (hypoxemia), an increase in partial carbon dioxide pressure in blood (hypercapnia) and small awakenings aiming to restore normal airflow (arousals)^{5,6}. These intermittent events of airway collapse lead to the development of comorbidities associated with OSA, especially cardiovascular, cerebrovascular and neurocognitive diseases, and a higher global mortality rate^{4,7}, which might be explained by the complex pathophysiology of OSA, including oxidative stress and metabolic dysfunction, systemic inflammation and immune activation, sympathetic activation and endothelial dysfunction, among others⁶.

A very powerful tool for the objective assessment of these links are biomarkers in blood, the measurement of which may also help in the prediction and screening, diagnosis and staging to the monitoring of a therapeutical response of almost any pathology⁸⁻¹⁰. The use of known biomarkers reflecting the abovementioned individual pathophysiological aspects of OSA could be a great aid to explain its close relationship with coronary disease and interpret the underlying molecular mechanisms.

Myeloperoxidase (MPO) is a known and well-established biomarker of oxidative stress¹¹. The concentration of soluble CD40 (sCD40) may approach endothelial dysfunction and immune activation¹², while systemic inflammation may be studied through the quantification of the high-sensitivity C-reactive protein (hsCRP) and the matrix metalloproteinase-9 (MMP9), which is also implicated in angiogenesis and tissue remodeling and plays a key role in atherosclerotic plaque development and atherothrombosis¹³. Other biomarkers for an integral assessment of cardiovascular-related diseases include N-terminal pro-brain natriuretic peptide (Nt-proBNP) as hemodynamic marker, and the placental growth factor (PlGF) and the soluble fms-like tyrosine-kinase domain-1 (sFlt1) as angiogenesis-related biomarkers¹⁴.

Therefore, the two objectives of this study were (1) to evaluate the impact of OSA on the association between cardiovascular risk biomarkers and ACS severity and (2) to assess the relationship of these biomarkers with OSA in patients after an acute coronary event.

MATERIALS AND METHODS

Study participants and procedures

This is an ancillary study of the ISAACC Study (NCT01335087), which is an open-label, parallel, prospective, randomized and controlled clinical trial and aims to evaluate whether CPAP treatment reduces the incidence of new cardiovascular events in OSA patients after a first ACS episode¹⁵. It started in April 2011, and patients were recruited across the country (15 hospitals), and provided written, informed consent. The study was approved by the Ethics Board of each participating center. ACS was defined as the acute presentation of coronary disease, with or without ST-elevation, unstable angina or MI type I¹⁶. The diagnosis of OSA was performed using the apnea-hypopnea index (AHI), based on the guidelines of the Spanish National consensus on the apnea-hypopnea syndrome¹⁷. An apnea was defined as the absence of airflow lasting ≥ 10 seconds, whereas a hypopnea was defined as a reduction in the airflow (between 30% and 90%) lasting ≥ 10 seconds accompanied by an oxyhemoglobin desaturation ($\geq 4\%$). AHI was calculated as the number of apneas and hypopneas per hour of sleep, and a threshold of 15 h^{-1} was used for the diagnosis of OSA, thus classifying participants as either ACS or ACS+OSA.

Moreover, demographic and anthropometric data were recorded from all participants, and a cardiorespiratory polygraphy was performed (Embletta, ResMed, Australia) the night following the coronary event. Oronasal flow, thoracoabdominal movements, an electrocardiogram and a pulse oximetry were continuously recorded.

ACS severity was routinely performed in terms of Killip score (upon hospital admission), ejection fraction and number of diseased vessels. The cut-off values

used were previously described in detail¹⁶. Other ICU-related complications, such as infections or venous thrombosis, were excluded.

Blood sampling and biochemical analyses

Fasting venous blood samples were drawn from all subjects the morning following the sleep study. After centrifugation, plasma and serum samples were stored at -80°C until analysis. The serum concentration of heart-type fatty acid-binding protein (HFABP) and non-esterified fatty acids (NEFA) were quantified using the H-FABP Immunoturbidimetric and NEFA Colorimetric kits, respectively (Randox Laboratories, UK). Insulin, the soluble fms-like tyrosine kinase-1(sFlt1), the placenta growth factor (PlGF) and the N-terminal pro-brain natriuretic peptide (Nt-proBNP) were measured on the Cobas e411 platform (Roche, Switzerland). The high-sensitivity C-reactive protein (hsCRP) was measured in serum at the Immulite 2000 platform (Siemens Diagnostics, Germany), whereas plasma myeloperoxidase (MPO), soluble CD40 and matrix metalloproteinase-9 (MMP9) were analyzed using the respective Human Quantikine ELISA kits (R&D Systems, USA). Analytical coefficients of variation were below 10% for all biomarkers.

Data analysis

All anthropometric, biochemical and sleep-related data were included in the ISAACC database. The mean values (and standard deviations) or the frequencies (and percentages) were compared for every variable between the ACS and ACS+OSA groups using the two-tailed Student's *t*-test (if normally distributed) or the Mann Whitney's *U*-test (if not).

A binary logistic regression was performed for every individual biomarker for the evaluation of the three ACS severity-related variables. Using the optimal cut-off

values, odds ratios (OR) and their confidence intervals were calculated. An OR-adjustment was performed for the presence of OSA as well as for other potentially confounding variables (age, gender, BMI, hypertension, diabetes, smoking status and drinking).

Receiver operating characteristics (ROC) curve analyses were performed for every single biomarker in the detection of OSA among our ACS patients, along with age and BMI. Areas under the ROC curves (AUCs) were integrated for the assessment of the diagnostic accuracy. Biomarker concentrations and clinical measurement combinations were assayed in the same fashion towards a maximization of the discriminating power. All statistical analyses were performed using the SPSS v19 software (IBM Corporation, USA), and the type α error was set at 0.05.

RESULTS

Study population

A total of 361 individuals with an ACS diagnosis evaluated in coronary care units or cardiology hospitalization were classified into two groups according to the presence of OSA, resulting in 152 participants without OSA and 209 participants with OSA.

The anthropometric, demographic and sleep-related characteristics of the participants are outlined on Table 1, together with the mean and standard deviations of the 11 biochemical markers. In the OSA group, individuals were older, with a higher BMI and more frequently hypertensive. More smokers (current and former) were detected in the non-OSA group. No differences in the prevalence of diabetes or dyslipidemia were seen, nor in the number of medications taken (data not shown). Among the biomarkers assayed, only PIGF and sFlt1 showed significant differences between groups ($p=0.006$ and $p=0.044$, respectively), even after adjusting for age and BMI. A positive significant correlation was seen between these angiogenesis-related biomarkers ($r=0.396$, $p<0.001$). Both hsCRP and MMP9 showed a tendency, but did not reach statistical significance between participants with and without OSA.

Biomarkers associated with ACS severity

The number of patients with a reduced ejection fraction or a greater number of diseased vessels was different depending on the presence of OSA (Table 1), whereas no significant difference was seen in the prevalence of an increased Killip score.

Several biomarkers showed a significant association with the different ACS severity-related variables, as shown on Table 2.

A Killip score above 1 was best associated with PIGF, Nt-proBNP or hsCRP as biochemical markers. A number of diseased vessels ≥ 3 could also be approached when using MMP9, insulin, PIGF or MPO, whereas a low ejection fraction was associated with Nt-proBNP or hsCRP. These observations remained significant when adjusted for OSA alone, as well as when adjusted for 8 potentially confounding variables (age, gender, BMI, hypertension, diabetes, OSA, smoking status and drinking status). The statistical significance after adjustment was reduced only for sCD40 on the Killip score and the number of diseased vessels.

Biomarkers for OSA detection

The parameter with the highest discrimination power for the detection of OSA in our population was BMI (AUC=0.687), which showed an OR for the detection of OSA of 4.39 after adjusting for age, and the best blood biomarkers for the classification of OSA in our cohort were PIGF, insulin, sFlt1 and MMP9 (AUC>0.555 for all of them), as outlined on Table 3.

Odds ratios of PIGF and MMP9 for the diagnosis of OSA were still significant after adjusting for age and BMI (PIGF adjusted OR: 1.64 (1.00-2.69); and MMP9 adjusted OR: 1.42 (1.13-2.08)).

Clinical data and biomarker concentrations were combined in different algorithms using mathematical and optimization models. The combination with the highest power of discrimination included age, BMI, PIGF and MMP9 after a log-transformation $(0.870 \cdot \log(\text{age}) + 1.479 \cdot \log(\text{BMI}) + 0.475 \cdot \log(\text{PIGF}) + 0.353 \cdot \log(\text{MMP9}) - 1.942)$. This combination yielded an AUC=0.741 (95% CI: 0.688-0.764; $p < 0.001$) for the diagnosis of OSA, hence maximizing the power of

discrimination over the individual variables in patients after an acute coronary event (Figure 1). The inclusion of any further variable in the algorithm did not improve the discriminating power.

DISCUSSION

The results of this study have shown that although some biomarkers were associated with ACS severity-related parameters, this association was independent of the presence of OSA or any other confounding variable assessed. Besides, individual clinical measures and biomarkers could distinguish between individuals with and without OSA in our population, and our results reveal that the combination of 4 parameters in a diagnostic algorithm could improve and maximize their discriminating power: age, BMI, PIGF and MMP9.

Biomarkers associated with ACS severity

Several biomarkers were found to be associated ACS severity in our population, especially those related with angiogenesis and hemodynamics (placental growth factor, Nt-proBNP...), which reached OR values up to 9 for hsCRP in the prediction of a high Killip score, up to 5 for Nt-proBNP in the prediction of a reduced ejection fraction and up to 3 for MMP9 in the prediction of an increased number of diseased vessels (Table 2). However, their association with ACS severity was independent of the presence of OSA or any relevant parameter assessed. Therefore, neither OSA nor the other variables seem to play any important role in the association between these biomarkers and ACS severity-related parameters.

Our findings are in accordance with previous studies assessing associations between non-myocardial necrosis biomarkers and ACS severity^{18,19}. As previously discussed by Ramasamy, FABP has been evaluated for the early prediction of adverse clinical outcomes in patients with suspected ACS, being a good predictor for long-term effects including cardiac death. Nt-proBNP and BNP measured upon admission were found to correlate with the magnitude of cardiac damage after AMI²⁰, and to predict left ventricular function²¹. Higher levels were also associated

with a more severe coronary vascular disease²². Myeloperoxidase and hsCRP also showed prognostic value for short-term adverse cardiac events^{23,24}, whereas controversial findings have been described for sCD40²⁵. Other biomarkers, such as β_2 -microglobulin, have also been related with the number of stenotic vessels and with coronary artery disease severity²⁶. Nevertheless, to our knowledge, this is the first study assessing the impact of OSA of the clinical association between biochemical markers and angiographic and echographic features following a coronary event.

Biomarkers for OSA detection

The highest accuracy for the diagnosis of OSA was achieved when age, BMI, MMP9 and PIGF were combined in a simple mathematical model. By doing this, each variable reflects a different pathophysiological element from the development of OSA. The addition of further variables did not significantly increase the ability to distinguish individuals with OSA from individuals without OSA among our population with coronary disease.

Age is a crucial risk factor, due to anatomical alterations and changes in the sleep patterns and quality²⁷. BMI is the major contributor to our algorithm. Obesity is currently accepted as one of the major risk factors for OSA and, in turn, OSA induces intermittent hypoxemia and may exacerbate hypoxia at a tissue level, thus causing metabolic dysfunction and oxidative stress^{5,28,29}. As clear and reciprocal interactions have been extensively described, it has been suggested that obesity and OSA might be understood not as separate pathologies, but as a complex individual entity³⁰.

As reported elsewhere, PIGF is associated with the presence of OSA in patients after a coronary event and plays a role in pathological angiogenesis^{31,32}. MMP9

levels in plasma have been associated with cardiovascular disease and mortality, probably by contributing to the weakening and rupture of the atherosclerotic plaques^{33–35}. Therefore, high MMP9 levels in patients without cardiovascular disease might represent low-grade systemic inflammation or initiation of atherosclerotic plaque development.

Previous studies have also assessed the combination of biomarkers for the evaluation of OSA in individuals with and without heart disease. Fleming et al³⁶ demonstrated that three different biomarkers combined (glycated hemoglobin, hsCRP and erythropoietin) could effectively predict OSA severity. Another study with several biomarkers concluded that the combination with highest accuracy for the distinction between moderate/severe OSA from mild/no OSA were insulin (measured before sleep) and IL-6 (measured after sleep)³⁷. Although our population was different, we believe that the inclusion of clinical variables in the algorithm could further improve diagnostic accuracy. To the best of our knowledge, this is the first study suggesting a biomarker combination for the screening of OSA in individuals with ACS.

The main limitations of our study include the implementation of these blood biomarkers in clinical practice, due to their limited access and the duration of their analytical quantification. The short-term nature of this study might not bring to light the rationale for the selection and true impact of the biomarkers, which will be further evaluated after a long-term follow-up of the patients. In addition, lack of harmonization in the measurements of troponin (the current most specific cardiac biomarker) made it not feasible to include it in the study. Moreover, although the suggested 4-parameter combination could be a good aid for OSA, it cannot substitute sleep polysomnography, as it is the gold standard not only for the

diagnosis of OSA but also for the staging and prognosis of such sleep-breathing disorder.

The fact that patients had non-sleepy OSA also represents a limitation on the potential clinical implications, since the benefit of identifying and treating OSA for the prevention of cardiovascular outcomes in these patients is uncertain.

CONCLUSIONS

In patients admitted after a coronary event, despite a combination of clinical measures and biomarkers could be useful for the detection of OSA, such biomarkers did not show any differential prognostic value in patients with sleep-disordered breathing.

Our mathematical model for the diagnosis of OSA integrates different aspects of the complex pathophysiology and epidemiology of the sleep apnea syndrome. Nevertheless, the presence of OSA in patients with ACS does not affect the association between biomarkers and severity-related variables.

REFERENCES

1. Anderson JL, Morrow DA. Acute Myocardial Infarction. *N Engl J Med*. 2017;376(21):2053-2064. doi:10.1056/NEJMra1606915.
2. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, et al. Third Universal Definition of Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2012;60(16):1581-1598. doi:10.1016/j.jacc.2012.08.001.
3. Bauters F, Rietzschel ER, Hertegonne KBC, Chirinos JA. The Link Between Obstructive Sleep Apnea and Cardiovascular Disease. *Curr Atheroscler Rep*. 2016;18(1):1-11. doi:10.1007/s11883-015-0556-z.
4. Javaheri S, Barbe F, Campos-Rodríguez F, et al. Sleep Apnea. Types, Mechanisms, and Clinical Cardiovascular Consequences. *J Am Coll Cardiol*. 2017;69(7):841-858. doi:10.1016/j.jacc.2016.11.069.
5. Lévy P, Kohler M, McNicholas WT, et al. Obstructive sleep apnoea syndrome. *Nat Rev Dis Prim*. 2015;(1):1-20. doi:10.1038/nrdp.2015.15.
6. Jordan AS, Mcsharry DG, Malhotra A. Adult obstructive sleep apnoea. *Lancet*. 2014;383(9918):736-747. doi:10.1016/S0140-6736(13)60734-5.
7. Dewan NA, Nieto FJ, Somers VK. Intermittent hypoxemia and OSA: Implications for comorbidities. *Chest*. 2015;147(1):266-274. doi:10.1378/chest.14-0500.
8. Strimbu K, Tavel JA. What are biomarkers? *Curr Opin HIV AIDS*. 2010;5(6):463-466. doi:10.1097/COH.0b013e32833ed177.
9. Fuentes-Arderiu X. What is a biomarker? It's time for a renewed definition. *Clin Chem Lab Med*. 2013;51(9):1689-1690. doi:10.1515/cclm-2013-0240.
10. de Araújo Freitas IG, de Bruin PFC, Bittencourt L, de Bruin VMS, Tufik S. What can blood biomarkers tell us about cardiovascular risk in obstructive sleep apnea? *Sleep Breath*. 2015;19(3):755-768. doi:10.1007/s11325-015-1143-9.
11. Apple FS, Smith SW, Pearce LA, Schulz KM, Ler R, Murakami MM. Myeloperoxidase improves risk stratification in patients with ischemia and normal cardiac troponin I concentrations. *Clin Chem*. 2011;57(4):603-608. doi:10.1373/clinchem.2010.158014.
12. Henn V, Steinbach S, Büchner K, Presek P, Kroczeck RA. The inflammatory action of CD40 ligand (CD154) expressed on activated human platelets is temporally limited by coexpressed CD40. *Blood*. 2001;98(4):1047-1054. doi:10.1182/blood.V98.4.1047.

13. Beaudoux J, Giral P, John M. Matrix metalloproteinases , inflammation and atherosclerosis : therapeutic perspectives. *Clin Chem Lab Med*. 2004;42(2):121-131.
14. Carnevale D, Lembo G. Placental Growth Factor and Cardiac Inflammation. *Trends Cardiovasc Med*. 2012;22(8):209-212. doi:10.1016/j.tcm.2012.07.022.
15. Esquinas C, Sanchez-de-la-Torre M, Aldoma A, et al. Rationale and methodology of the impact of continuous positive airway pressure on patients with ACS and nonsleepy OSA : the ISAACC trial. *Clin Cardiol*. 2013;36(9):495-501. doi:10.1002/clc.22166.
16. Barbé F, Sánchez-De-la-torre A, Abad J, et al. Effect of obstructive sleep apnoea on severity and short-term prognosis of acute coronary syndrome. *Eur Respir J*. 2015;45(2):419-427. doi:10.1183/09031936.00071714.
17. Spanish National Consensus. Sleep apnea-hypopnea syndrome (SAHS) [article in Spanish]. *Arch Bronconeumol*. 2015;41(Suppl 4):7-9. doi:10.1007/s11325-015-1143-9.
18. Ramasamy I. Biochemical markers in acute coronary syndrome. *Clin Chim Acta*. 2011;412(15-16):1279-1296. doi:10.1016/j.cca.2011.04.003.
19. Galvani M, Ferrini D, Ottani F. Natriuretic peptides for risk stratification of patients with acute coronary syndromes. *Eur J Heart Fail*. 2004;6(3):327-333. doi:10.1016/j.ejheart.2004.01.006.
20. Ndrepepa G, Braun S, Mehilli J, et al. N-Terminal Pro-Brain Natriuretic Peptide on Admission in Patients With Acute Myocardial Infarction and Correlation With Scintigraphic Infarct Size, Efficacy of Reperfusion, and Prognosis. *Am J Cardiol*. 2006;97(8):1151-1156. doi:10.1016/j.amjcard.2005.11.029.
21. Omland T, Aakvaag A, Bonarjee v v s, Caidahl K, Lie r t. Plasma brain natriuretic peptide as an indicator of left ventricular systolic function and long-term survival after acute myocardial infarction. *Circulation*. 1996;93:1963-1969. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9008480>.
22. Sadanandan S, Cannon CP, Chekuri K, et al. Association of elevated B-type natriuretic peptide levels with angiographic findings among patients with unstable angina and non-ST-segment elevation myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2004;44(3):564-568. doi:10.1016/j.jacc.2004.03.072.
23. Roman RM, Camargo PV, Borges FK, Rossini AP, Polanczyk CA. Prognostic value

- of myeloperoxidase in coronary artery disease: Comparison of unstable and stable angina patients. *Coron Artery Dis.* 2010;21(3):129-136.
doi:10.1097/MCA.0b013e328333f50d.
24. Osman R, L'Allier PL, Elgharib N, Tardif JC. Critical appraisal of C-reactive protein throughout the spectrum of cardiovascular disease. *Vasc Health Risk Manag.* 2006;2(3):221-237. doi:10.2147/vhrm.2006.2.3.221.
 25. Olenchock BA, Wiviott SD, Murphy SA, et al. Lack of association between soluble CD40L and risk in a large cohort of patients with acute coronary syndrome in OPUS TIMI-16. *J Thromb Thrombolysis.* 2008;26(2):79-84. doi:10.1007/s11239-007-0156-z.
 26. You L, Xie R, Hu H, et al. High levels of serum β 2-microglobulin predict severity of coronary artery disease. *BMC Cardiovasc Disord.* 2017;17(1):1-8.
doi:10.1186/s12872-017-0502-9.
 27. Edwards B, O'Driscoll D, Ali A, Jordan A, Trinder J, Malhotra A. Aging and Sleep: Physiology and Pathophysiology. *Semin Respir Crit Care Med.* 2010;31(5):618-633.
doi:10.1055/s-0030-1265902.Aging.
 28. Ryan S, Taylor CT, McNicholas WT. Selective activation of inflammatory pathways by intermittent hypoxia in obstructive sleep apnea syndrome. *Circulation.* 2005;112(17):2660-2667. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.556746.
 29. Miller JD, Aronis KN, Chrispin J, et al. Obesity, Exercise, Obstructive Sleep Apnea, and Modifiable Atherosclerotic Cardiovascular Disease Risk Factors in Atrial Fibrillation. *J Am Coll Cardiol.* 2015;66(25):2899-2906.
doi:10.1016/j.jacc.2015.10.047.
 30. Farr OM, Mantzoros CS. Sleep apnea in relation to metabolism: An urgent need to study underlying mechanisms and to develop novel treatments for this unmet clinical need. *Metabolism.* 2017;69:207-210. doi:10.1016/j.metabol.2017.01.028.
 31. Carmeliet P, Moons L, Lutun A, et al. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med.* 2001;7(5):575-583.
 32. Barcelo A, Bauça JM, Yañez A, et al. Impact of Obstructive Sleep Apnea on the Levels of Placental Growth Factor (PIGF) and Their Value for Predicting Short-Term Adverse Outcomes in Patients with Acute Coronary Syndrome. *PLoS One.* 2016;11(3):e0147686. doi:10.1371/journal.pone.0147686.

33. Jefferis BJ, Whincup P, Welsh P, et al. Prospective study of matrix metalloproteinase-9 and risk of myocardial infarction and stroke in older men and women. *Atherosclerosis*. 2010;208(2):557-563. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2009.08.018.
34. Kai H, Ikeda H, Yasukawa H. Peripheral Blood Levels of Matrix Metalloproteases-2 and -9 Are Elevated in Patients With Acute Coronary Syndromes. *J Am Coll Cardiol*. 1998;32(2):368-372. doi:10.1016/S0735-1097(98)00250-2.
35. Alvarez B, Ruiz C, Chacón P, Alvarez-Sabin J, Matas M. Serum values of metalloproteinase-2 and metalloproteinase-9 as related to unstable plaque and inflammatory cells in patients with greater than 70 % carotid artery stenosis . *J Vasc Surg*. 2004;40(3):469-475. doi:10.1016/j.jvs.
36. Fleming WE, Ferouz-Colborn A, Samoszuk MK, et al. Blood biomarkers of endocrine , immune , in fl ammatory , and metabolic systems in obstructive sleep apnea. *Clin Biochem*. 2016. doi:10.1016/j.clinbiochem.2016.05.005.
37. Maeder MT, Strobel W, Christ M, et al. Comprehensive biomarker profiling in patients with obstructive sleep apnea. *Clin Biochem*. 2014. doi:10.1016/j.clinbiochem.2014.09.005.

Table 1. Anthropometric, sleep-related data, prevalence of ACS complications

	No OSA N=152	OSA N=209	p-value
Anthropometric data			
Age, years	57.1 ± 11.9	60.2 ± 10.6	0.014*
Male, N	132 (86.8%)	168 (80.4%)	0.119
BMI, kg/m ²	26.75 ± 3.77	29.33 ± 4.42	<0.001*
Hypertension, N	57 (37.5%)	127 (60.8%)	<0.001*
Diabetes, N	32 (21.1%)	51 (24.4%)	0.527
Dyslipidemia, N	82 (53.9%)	125 (59.8%)	0.282
Smoking status, N			0.041*
- Yes	72 (47.4%)	93 (44.5%)	
- No	36 (23.7%)	73 (34.9%)	
- Former	44 (28.9%)	43 (20.6%)	
Current or former drinker, N	50 (32.9%)	46 (22.0%)	0.022*
Sleep-related variables			
AHI, h ⁻¹	6.2 ± 4.1	34.8 ± 17.5	<0.001*
Mean O ₂ saturation, %	93.1 ± 2.1	93.2 ± 2.0	<0.001*
O ₂ desaturation index, h ⁻¹	9.9 ± 36.2	32.7 ± 41.7	<0.001*
Time with SatO ₂ <90%, min	16.6 ± 44.3	41.0 ± 67.2	<0.001*
Epworth Sleepiness Score	5.3 ± 2.4	5.4 ± 2.5	0.646
ACS severity-related variables			
Killip score >1, N	8 (5.9%)	16 (8.9%)	0.323
Affected vessels ≥3, N	22 (15.7%)	48 (25.5%)	0.041*
Ejection fraction <51.5%, N	30 (27.8%)	58 (42.0%)	0.023*
Biomarker concentrations			
HFABP, ng/mL	6.73 ± 3.40	6.56 ± 3.42	0.635
NEFA, mmol/L	0.64 ± 0.44	0.67 ± 0.51	0.558
Albumin, g/L	37.54 ± 3.59	37.00 ± 3.53	0.138
sCD40, pg/mL	431.1 ± 147.6	467.6 ± 255.2	0.470
Insulin, μIU/mL	11.9 ± 9.2	15.0 ± 15.5	0.018*
Nt-proBNP, pg/mL	956.0 ± 1677.6	1120.1 ± 2396.6	0.339
PIGF, pg/mL	18.83 ± 5.72	20.57 ± 5.97	0.006*
sFlt1, pg/mL	95.14 ± 77.43	105.09 ± 163.13	0.044*
MMP9, ng/mL	856.2 ± 1414.6	952.62 ± 1225.1	0.075
MPO, ng/mL	318.6 ± 230.7	359.5 ± 251.2	0.128
hsCRP, mg/L	36.08 ± 61.19	41.34 ± 60.87	0.077

*significant at p<0.05 level

Non-standard abbreviations: BMI (body-mass index), AHI (apnea-hypopnea index), HFABP (heart fatty acid-binding protein), NEFA (non-esterified fatty acids), Nt-proBNP (N-terminal region of the

brain natriuretic peptide), PIGF (platelet growth factor), sFlt1 (soluble fraction of fms-like tyrosine kinase 1), MMP9 (matrix metalloproteinase 9), MPO (myeloperoxidase), hsCRP (high-sensitivity C-reactive protein).

Table 2. Odds ratios for the prediction of ACS severity-related variables by means of biomarkers (binary logistic regression)

	Killip score >1 ^a			Number of diseased vessels ≥3 ^b			Ejection fraction <51.5% ^c		
	Non-adjusted OR (95% CI)	OSA-adjusted OR (95% CI)	Adjusted OR* (95% CI)	Non-adjusted OR (95% CI)	OSA-adjusted OR (95% CI)	Adjusted OR* (95% CI)	Non-adjusted OR (95% CI)	OSA-adjusted OR (95% CI)	Adjusted OR* (95% CI)
hFABP	2.907 (1.170-7.222)	2.916 (1.172-7.253)	2.818 (1.097-7.238)	2.309 (1.350-3.947)	2.436 (1.414-4.196)	2.072 (1.153-3.721)	NS	NS	NS
NEFA	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Albumin	4.472 (1.904-10.502)	4.311 (1.820-10.214)	3.646 (1.468-9.057)	NS	NS	NS	2.674 (1.471-4.861)	2.761 (1.507-5.058)	3.530 (1.831-6.803)
sCD40	2.850 (1.228-6.614)	2.807 (1.208-6.525)	2.176 (0.883-5.364)	1.932 (1.132-3.297)	1.872 (1.093-3.207)	1.459 (0.798-2.669)	NS	NS	NS
Insulin	NS	NS	NS	2.662 (1.536-4.615)	2.513 (1.442-4.380)	2.938 (1.580-5.461)	NS	NS	NS
Nt-proBNP	5.432 (1.812-16.284)	5.362 (1.787-16.093)	4.756 (1.544-14.650)	NS	NS	NS	4.994 (2.765-9.019)	5.070 (2.787-9.223)	5.355 (2.847-10.073)
PIGF	5.662 (1.888-16.975)	5.518 (1.836-16.582)	5.056 (1.645-15.539)	2.547 (1.477-4.392)	2.477 (1.431-4.287)	2.131 (1.191-3.813)	2.271 (1.332-3.871)	2.177 (1.270-3.731)	2.369 (1.334-4.208)
sFlt1	NS	NS	NS	NS	NS	NS	2.099 (1.211-3.638)	2.035 (1.167-3.548)	2.125 (1.186-3.805)
MMP9	NS	NS	NS	2.501 (1.435-4.361)	2.392 (1.367-4.186)	3.122 (1.690-5.767)	NS	NS	NS
MPO	NS	NS	NS	2.307 (1.337-3.978)	2.275 (1.314-3.940)	2.062 (1.132-3.756)	NS	NS	NS
hsCRP	7.827 (3.271-18.732)	7.635 (3.155-18.475)	9.753 (3.480-27.336)	2.008 (1.158-3.482)	1.939 (1.114-3.375)	1.780 (0.990-3.201)	2.810 (1.641-4.811)	2.749 (1.597-4.731)	2.997 (1.694-5.301)

^aOptimal cut-off values: HFABP>5.9ng/mL, albumin<34.7g/L, sCD40 >469.7pg/mL, Nt-proBNP>485.6pg/mL, PIGF>18.6 pg/mL, hsCRP>59.0mg/L.

^bOptimal cut-off values: HFABP>6.7ng/mL, sCD40>441.1pg/mL, insulin>13.2μIU/mL, PIGF>19.2pg/mL, MMP9>501.8ng/mL, MPO>418.2ng/mL, hsCRP>14.2mg/L.

^cOptimal cut-off values: albumin<39.0g/L, Nt-proBNP>461.4pg/mL, PIGF>19.6pg/mL, sFlt1>81.72pg/mL, hsCRP>20.3mg/L.

*Adjusted for 8 variables: OSA, age, gender, BMI, hypertension, diabetes, smoking, drinking status.

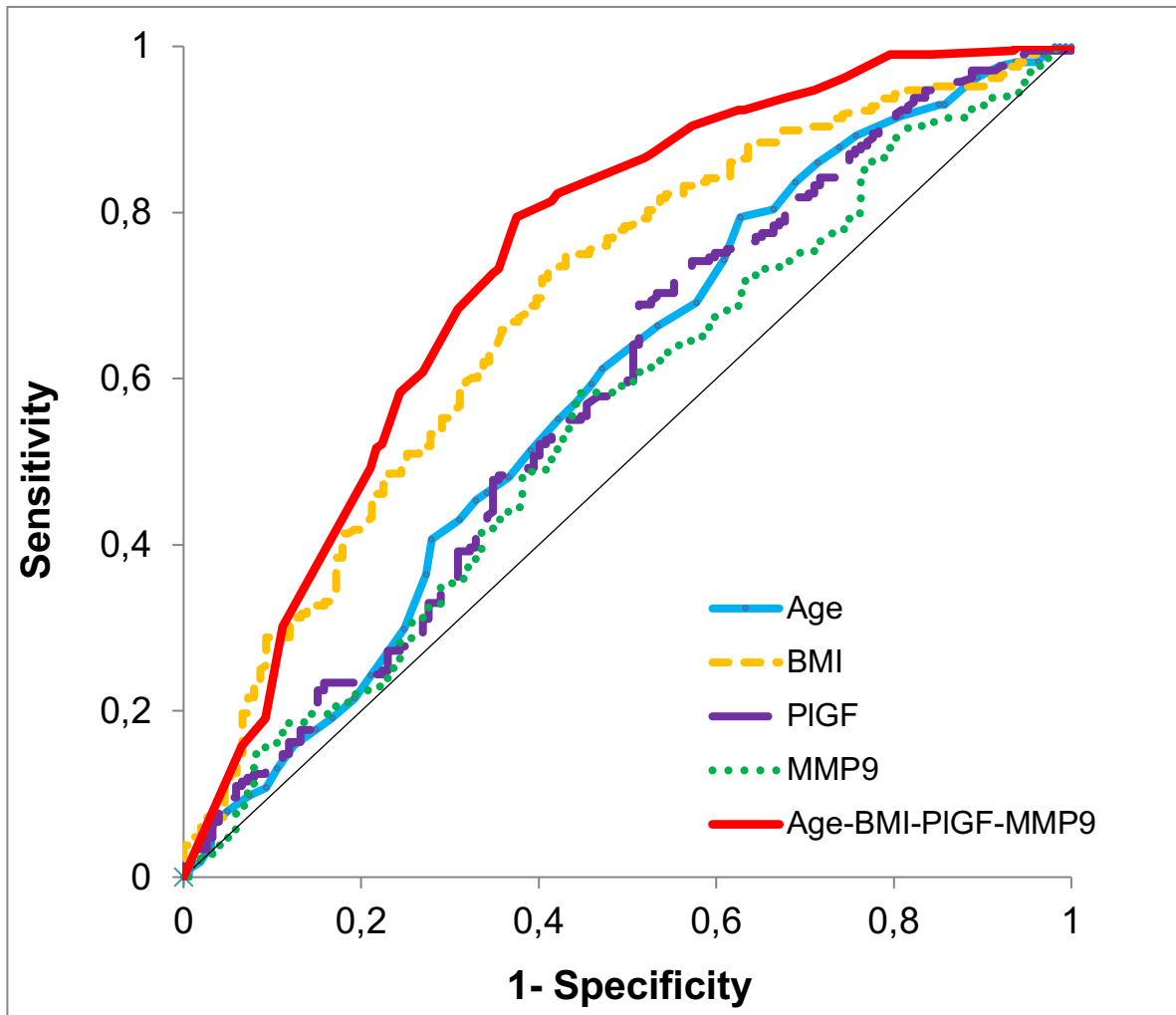
Abbreviations: NS: not significant, OR: odds ratio, CI: confidence interval, HFABP (heart fatty acid-binding protein), NEFA (non-esterified fatty acids), Nt-proBNP (N-terminal region of the brain natriuretic peptide), PIGF (platelet growth factor), sFlt1 (soluble fraction of fms-like tyrosine kinase 1), MMP9 (matrix metalloproteinase 9), MPO (myeloperoxidase), hsCRP (high-sensitivity C-reactive protein).

Table 3. Area under the ROC curve for the diagnosis of OSA in patients after an ACS (biomarkers not reaching statistical significance are not shown)

	AUC	CI 95%	p-value	Optimal cut-off value (sensitivity and specificity, %)
Clinical measures				
Age	0.576	0.515-0.636	0.014	48.5 (Se 85%, Sp 29%)
BMI	0.687	0.631-0.742	<0.001	26.8 (Se 75%, Sp 57%)
Individual biomarkers				
Insulin	0.573	0.513-0.633	0.018	8.8 (Se 66.5%, Sp 47.4%)
PIGF	0.584	0.524-0.645	0.006	17.2 (Se 73.2%, Sp 44.7%)
sFlt1	0.562	0.501-0.623	0.044	68.2 (Se 76.1%, Sp 37.5%)
MMP9	0.555	0.495-0.615	0.075	459.9 (Se 58.4%, Sp 55.3%)
hsCRP	0.554	0.494-0.614	0.077	32.7 (Se 34.9%, Sp 75.7%)
Clinical and biomarker combinations				
BMI + Age + PIGF	0.702	0.646-0.757	<0.001	NA
BMI + Age + MMP9	0.709	0.654-0.764	<0.001	NA
BMI + Age + PIGF + MMP9	0.741	0.688-0.764	<0.001	NA

Abbreviations: AUC: area under the ROC curve, CI: confidence interval, BMI: body mass index, PIGF: placental growth factor, sFlt1: soluble fraction of fms-like tyrosine kinase 1, MMP9: matrix metalloproteinase 9, hsCRP: high-sensitivity C-reactive protein, NA: not applicable.

Figure 1. Receiver operating characteristics (ROC) curve for the diagnosis of OSA after a coronary event.



Supplemental Table. Age, BMI, AHI and biomarker values according to ACS severity-related parameters.

	Killip score ≤1	Killip score >1	p-value	Diseased vessels ≥3	Diseased vessels <3	p-value	Ejection fraction <51.5%	Ejection fraction ≥51.5%	p-value
Age, years	58.22 (10.99)	61.96 (12.85)	0.134	57.81 (11.12)	62.63 (10.81)	0.002*	58.83 (11.17)	58.70 (11.26)	0.869
BMI, kg/m ²	28.12 (4.20)	28.39 (3.90)	0.706	28.02 (4.00)	28.39 (5.08)	0.805	27.62 (3.95)	28.07 (4.22)	0.486
AHI, h ⁻¹	22.92 (20.29)	20.80 (15.62)	0.924	21.24 (19.14)	26.70 (19.96)	0.025*	25.13 (19.39)	21.30 (20.21)	0.054
HFABP, ng/mL	6.42 (3.13)	8.05 (3.94)	0.015*	6.32 (3.06)	7.76 (4.47)	0.013*	6.82 (6.82)	6.47 (3.40)	0.209
NEFA, mmol/L	0.65 (0.42)	0.72 (0.73)	0.826	0.64 (0.45)	0.63 (0.39)	0.775	0.65 (0.40)	0.62 (0.38)	0.465
Albumin, g/L	37.42 (3.51)	35.33 (3.71)	0.008*	37.18 (3.64)	37.50 (3.69)	0.464	36.60 (3.83)	38.32 (3.33)	0.001*
sCD40, pg/mL	425.0 (157.4)	573.0 (343.4)	0.017	427.0 (165.3)	549.3 (349.8)	0.023*	454.0 (222.3)	421.1 (181.6)	0.104
Insulin, μIU/mL	16.12 (30.61)	12.03 (8.16)	0.860	13.31 (13.40)	23.76 (58.21)	0.044*	19.30 (50.44)	15.26 (15.43)	0.792
Nt-proBNP, pg/mL	869 (1453)	2233 (2937)	<0.001*	843 (1385)	1606 (3514)	0.067	1528 (2163)	733.6 (1181)	<0.001*
PIGF, pg/mL	19.24 (5.63)	24.58 (7.28)	<0.001*	19.36 (5.85)	21.33 (5.39)	0.001*	21.24 (6.43)	18.65 (4.82)	0.002*
sFlt1, pg/mL	99.12 (142.8)	119.0 (117.7)	0.352	90.07 (57.66)	125.8 (271.2)	0.097	125.0 (244.7)	82.54 (43.23)	0.061
MMP9, ng/mL	879 (1127)	1023 (1399)	0.334	824.5 (1129)	1060 (1114)	0.011*	1144 (1314)	985.4 (1191)	0.579
MPO, ng/mL	325.8 (231.2)	405.3 (282.2)	0.195	322.6 (241.0)	408.2 (241.8)	0.003*	351.3 (239.2)	308.1 (225.2)	0.129
hsCRP, mg/L	58.22 (10.99)	94.44 (97.70)	0.001*	36.75 (61.34)	46.48 (63.68)	0.071	58.81 (79.10)	29.51 (50.90)	0.003*

*Significant at p<0.05 level

5. CONCLUSIONES

Esta tesis se ha planteado para mejorar el conocimiento de los mecanismos fisiopatológicos que relacionan el síndrome de apneas-hipopneas del sueño con el síndrome coronario agudo. A través de los 3 trabajos expuestos se ha llegado a las siguientes conclusiones finales:

Primer estudio:

- En individuos que han sufrido un síndrome coronario agudo, los niveles plasmáticos de PIGF están asociados con la gravedad de éste y con la presencia de SAHS.
- La capacidad predictiva de los niveles de PIGF así como su expresión cardiaca tras un daño isquémico están influenciados por diferentes mecanismos fisiopatológicos, tanto en pacientes con o sin SAHS.

Segundo estudio:

- La elevación de nucleosomas y dsDNA en pacientes con SAHS podría estar relacionada con el aumento del riesgo cardiovascular descrito en estos pacientes.
- La elevación sérica de biomarcadores relacionados con la muerte celular que ocurre tras un síndrome coronario agudo es independiente de la presencia de SAHS.

Tercer estudio:

- La capacidad de los biomarcadores metabólicos, hemodinámicos e inflamatorios en la predicción de la gravedad de un SCA es independiente de la presencia de SAHS.
- En pacientes tras un evento coronario agudo, algunos biomarcadores individuales, como la insulina, el PIGF y el sFlt1, pueden ser útiles para detectar la presencia de SAHS. La combinación de variables antropométricas y biomarcadores en un algoritmo tiene mayor poder de detección de SAHS que los parámetros individuales.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Javaheri S, Barbe F, Campos-Rodríguez F, et al. Sleep Apnea. Types, Mechanisms, and Clinical Cardiovascular Consequences. *J Am Coll Cardiol*. 2017;69(7):841-858.
2. Lévy P, Kohler M, McNicholas WT, et al. Obstructive sleep apnoea syndrome. *Nat Rev Dis Prim*. 2015;(1):1-20.
3. Jordan AS, Mcsharry DG, Malhotra A. Adult obstructive sleep apnoea. *Lancet*. 2014;383(9918):736-747.
4. Edwards B, O'Driscoll D, Ali A, Jordan A, Trinder J, Malhotra A. Aging and Sleep: Physiology and Pathophysiology. *Semin Respir Crit Care Med*. 2010;31(5):618-633.
5. Verstraeten E. Neurocognitive effects of obstructive sleep apnea syndrome . *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2007;7:161-166.
6. Punjabi N, Goodwin J, Gottlieb D, Newman A, Connor G. Sleep - disordered breathing and mortality : a prospective cohort study . *PLoS Med*. 2009;6:e1000132.
7. Wingard D, Berkman L. Mortality risk associated with sleeping patterns among adults . *Sleep*. 1983;6:102-107.
8. Kasper D, Fauci A, Hauser S, Longo D, Jameson JL, Loscalzo J. *Harrison. Principios de Medicina Interna (19 Edición).*; 2016.
9. Carskadon MA, Wolfson a r, Acebo C, Tzischinsky O, Seifer R. Adolescent sleep patterns , circadian timing, and sleepiness at a transition to early school days . *Sleep*. 1998;21(8):871-881.
10. Sateia MJ. International classification of sleep disordersthird edition: highlights and modifications. *Chest*. 2014;146(5):1387-1394.
11. Kimoff RJ. When to Suspect Sleep Apnea and What to Do About It. *Can J Cardiol*. 2015;31(7):945-948.
12. Phillipson EA. Sleep Apnea -- A Major Public Health Problem. *N Engl J Med*. 1993;328(17):1271-1273. doi:2.
13. Malhotra A, Huang Y, Fogel R, et al. Aging influences on pharyngeal anatomy and physiology: the predisposition to pharyngeal collapse. *Am J Med*. 2006;119:e9-e14.
14. Martin SE, Mathur R, Marshall I, Douglas NJ. The effect of age, sex, obesity and posture on upper airway size. *Eur Respir J*. 1997;10(9):2087-2090.
15. Thurnheer R, Wraith PK, Douglas NJ. Influence of age and gender on upper airway resistance in NREM and REM sleep. *J Appl Physiol*. 2001;90(3):981-988.

16. Malhotra A, Huang Y, Fogel R. The male predisposition to pharyngeal collapse : importance of airway length . *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;166:1388-1395.
17. Kairaitis K, Byth K, Parikh R, Stavrinou R, Wheatley JR, Amis TC. Tracheal traction effects on upper airway patency in rabbits: the role of tissue pressure. *Sleep*. 2007;30(2):179-186.
18. Bradley TD, Brown IG, Grossman RF, et al. Pharyngeal size in snorers, nonsnorers, and patients with obstructive sleep apnea. *N Engl J Med*. 1986;315(21):1327-1331.
19. Begle RL, Badr S, Skatrud JB, Dempsey JA. Effect of lung inflation on pulmonary resistance during NREM sleep. *Am Rev Respir Dis*. 1990;141:854-860.
20. White LH, Bradley TD. Role of nocturnal rostral fluid shift in the pathogenesis of obstructive and central sleep apnea. *J Physiol*. 2013;1179-1193.
21. Yumino D, Wang H, Floras JS, Newton GE, Mak S, Bradley TD. Prevalence and physiological predictors of sleep apneas in patients with heart failure and systolic dysfunction. *J Card Fail*. 2009;15:279-285.
22. Yadollahi A, Vena D, Lyons OD, Bradley TD. Relationship of fluid accumulation in the neck to sleep structure in men during daytime sleep. *Sleep Med*. 2016;12(10):1365-1371.
23. Browne HAK, Adams L, Simonds AK, Morrell MJ. Ageing does not influence the sleep-related decrease in the hypercapnic ventilatory response. *Eur Respir J*. 2003;21(3):523-529.
24. Malhotra A, Loscalzo J. Sleep and cardiovascular disease: an overview. 2010;51(4):279-284.
25. Schwab RJ, Pasirstein M, Pierson R, et al. Identification of Upper Airway Anatomic Risk Factors for Obstructive Sleep Apnea with Volumetric Magnetic Resonance Imaging. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;168:964-971.
26. Marcus CL, Brooks LJ, Draper KA, et al. Diagnosis and Management of Childhood Obstructive Sleep Apnea Syndrome. *Pediatrics*. 2012;130(3):576-584.
27. Young T, Skatrud J, Peppard PE. Risk Factors for Obstructive Sleep Apnea in Adults. *Am Med Assoc*. 2004;291(16):2013-2016.
28. Stradling JR, Davies RJO. Obstructive sleep apnoea/hypopnoea syndrome: definitions, epidemiology, and natural history. *Thorax*. 2004;59(1):73-78.
29. Peppard PE, Young T, Barnet JH, Palta M, Hagen EW, Hla KM. Increased Prevalence of Sleep-Disordered Breathing in Adults. *Am J Epidemiol*. 2013;177(9):1006-1014.
30. Dixon JB, Schachter LM, O'Brien PE, et al. Surgical vs Conventional Therapy for Weight Loss Treatment of Obstructive Sleep Apnea: A Randomized Controlled Trial. *J Am Med Assoc*.

2012;308(11):1142-1149.

31. Drager LF, Brunoni AR, Jenner R, Lorenzi-Filho G, Bonseñor IM, Lotufo PA. Effects of CPAP on body weight in patients with obstructive sleep apnoea: a meta-analysis of randomised trials. *Thorax*. 2015;70:258-264.
32. Young T. Epidemiology of Obstructive Sleep Apnea: A Population Health Perspective. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;165(9):1217-1239.
33. Farr OM. Sleep apnea in relation to metabolism: An urgent need to study underlying mechanisms and to develop novel treatments for this unmet clinical need. *Metabolism*. 2017;69:207-210.
34. Patil S, Schneider H, Gladmon E. A simplified method for measuring critical pressures during sleep in the clinical setting . *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;169:A435.
35. Pillar G, Malhotra A, Fogel R, Beauregard J, Schnall R, Dp W. Airway mechanics and ventilation in response to resistive loading during sleep : influence of gender . *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;162:1627-1632.
36. Kirkness JP, Schwartz AR, Schneider H, et al. Contribution of male sex , age , and obesity to mechanical instability of the upper airway during sleep. *J Appl Physiol*. 2008;104:1618-1624.
37. Young T, Palta M, Dempsey J, Skatrud J, Weber S, Badr S. The occurrence of sleep - disordered breathing among middle - aged. *N Engl J Med*. 1993;32:1230-1235.
38. Marcus C. Obstructive sleep apnea syndrome : differences between children and adults . *Sleep*. 2000;23(Suppl 4):S140-S141.
39. Bliwise D. Sleep in normal aging and dementia . PubMed Commons. *Sleep*. 1993;16:40-81.
40. Feinsilver S, Hertz G. Sleep in the elderly patient . *Clin Chest Med*. 1993;14:405-411.
41. Ohayon M. Epidemiology of insomnia : what we know and what we still need to. *Sleep Med Rev*. 2002;6(2):97-111.
42. Dudley KA, Patel SR. Disparities and genetic risk factors in obstructive sleep apnea. *Sleep Med*. 2016;18:96-102.
43. Rosen C, Larkin E, Kirchner H. Prevalence and risk factors for sleep-disordered breathing in 8 to 11 year old children: association with race and prematurity. *J Pediatr*. 2003;142(4):383-389.
44. Redline S, Tishler P V., Hans MG, Tosteson TD, Strohl KP, Spry K. Racial differences in sleep-disordered breathing in African-Americans and Caucasians. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;155(1):186-192.

45. Cakirer B, Hans MG, Graham G, Aylor J, Tishler P V., Redline S. The relationship between craniofacial morphology and obstructive sleep apnea in whites and in African-Americans. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;163(4):947-950.
46. Lee RWW, Vasudavan S, Hui DS, et al. Differences in craniofacial structures and obesity in Caucasian and Chinese patients with obstructive sleep apnea. *Sleep.* 2010;33(8):1075-1080.
47. Parati G, Lombardi C, Hedner J, et al. Recommendations for the management of patients with obstructive sleep apnoea and hypertension. *Eur Respir J.* 2013;41(3):523-538.
48. Gislason T, Johannsson JH, Haraldsson A, et al. Familial predisposition and cosegregation analysis of adult obstructive sleep apnea and the sudden infant death syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;166(6):833-838.
49. Gottlieb DJ, Whitney CW, Bonekat WH, et al. Relation of sleepiness to respiratory disturbance index: The sleep heart health study. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;159(2):502-507.
50. Drager LF, McEvoy RD, Barbe F, Lorenzi-Filho G, Redline S. Sleep Apnea and Cardiovascular Disease: Lessons From Recent Trials and Need for Team Science. *Circulation.* 2017;136(19):1840-1850.
51. Lloberes P, Durán-Cantolla J, Martínez-García MÁ, et al. Diagnóstico y tratamiento del síndrome de apneas-hipopneas del sueño. *Arch Bronconeumol.* 2011;47(3):143-156.
52. Morales CR, Hurley S, Wick LC, et al. In-Home, Self-Assembled Sleep Studies Are Useful in Diagnosing Sleep Apnea in the Elderly 2012. *Sleep.* 2012;35(11):1491-1501.
53. Grigg-Damberger MM. The AASM Scoring Manual Four Years Later. *J Clin Sleep Med.* 2012;8(3):323-332.
54. Camarasa Escrig A, Gonzalez Vergara D, Serrano Rebollo J, Barbe F. El síndrome de apnea-hipopnea del sueño en 2009. *Arch Bronconeumol.* 2009;45 Suppl 3(1579-2129 (Electronic)):14-21.
55. Guilleminault C, Tilkian A, Dement WC. The sleep apnea syndromes. *Annu Rev Med.* 1976;27:465-484.
56. Kaditis AG, Alvarez MLA, Boudewyns A, et al. Obstructive sleep disordered breathing in 2- to 18-year-old children: Diagnosis and management. *Eur Respir J.* 2016;47(1):69-94.
57. Peña-Zarza JA, De la Peña M, Yañez A, et al. Glycated hemoglobin and sleep apnea syndrome. *Sleep Breath.* 2017.
58. Johns M. A new method for measuring daytime sleepiness: The Epworth sleepiness scale.

- Sleep Biol Rhythms*. 1991;14(6):540-545.
59. Hardinge FM, Pitson DJ, Stradling JR. Use of the Epworth Sleepiness Scale to demonstrate response to treatment with nasal continuous positive airways pressure in patients with obstructive sleep apnoea. *Respir Med*. 1995;89(9):617-620.
 60. Costa C, Santos B, Severino D, et al. Obstructive sleep apnea syndrome: An important piece in the puzzle of cardiovascular risk factors. *Clínica e Investig en Arterioscler publicación Of la Soc Española Arterioscler*. 2015;27(5):256-263.
 61. Plante DT. Sleep propensity in psychiatric hypersomnolence: a systematic review and meta-analysis of multiple sleep latency test findings. *Sleep Med Rev*. 2017;31:48-57.
 62. Carskadon MA, Dement WC, Mitler MM, Roth T, Westbrook PR, Keenan S. Guidelines for the Multiple Sleep Latency Test (MSLT): a standard measure of sleepiness. *Sleep*. 1986;9:519-524.
 63. Dauvilliers Y, Buguet A. Hypersomnia. *Dialogues Clin Neurosci*. 2005;7(4):347-356.
 64. Findley LJ, Fabrizio M, Thommi G, Suratt P. Severity of sleep apnea and automobile crashes. *N Engl J Med*. 1989;320(13):868-869.
 65. Dempsey JA, Veasey SC, Morgan BJ, Donnell CPO. Pathophysiology of Sleep Apnea. *Physiol Rev*. 2010;90:47-112.
 66. Mendelson M, Lyons OD, Yadollahi A, Inami T, Oh P, Bradley TD. Effects of exercise training on sleep apnoea in patients with coronary artery disease : a randomised trial. *Eur Respir J*. 2016:1-9.
 67. Yaggi KH, Concato J, Kernan WN, Lichtman JH, Brass LM, Mohsenin V. Obstructive sleep apnea as a risk factor for stroke and death. *N Engl J Med*. 2005;353(19):2034-2041.
 68. McNicholas WT, Bonsignore MR. Sleep apnoea as an independent risk factor for cardiovascular disease: current evidence, basic mechanisms and research priorities. *Eur Respir J*. 2006;29(1):156-178.
 69. Schober AK, Neurath MF, Harsch IA. Prevalence of sleep apnoea in diabetic patients. *Clin Respir J*. 2011;5(3):165-172.
 70. Aurora RN, Punjabi NM. Obstructive sleep apnoea and type 2 diabetes mellitus: a bidirectional association. *Lancet Respir Med*. 2014;1(10):786-792.
 71. Martínez-García MÁ, Campos-Rodríguez F, Almendros I, Farré R. Relationship Between Sleep Apnea and Cancer. *Arch Bronconeumol*. 2015;51(9):456-461.
 72. Campos-Rodríguez F, Martínez-García MA, Martínez M, et al. Association between obstructive

- sleep apnea and cancer incidence in a large multicenter spanish cohort. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;187(1):99-105.
73. Barcelo A, Barbe F. Estrés oxidativo y síndrome de apneas-hipopneas del sueño. *Arch Bronconeumol*. 2005;41:393-399.
 74. Lévy P, Pépin JL, Arnaud C, et al. Intermittent hypoxia and sleep-disordered breathing: Current concepts and perspectives. *Eur Respir J*. 2008;32(4):1082-1095.
 75. Lavie P, Herer P, Hoffstein V. Obstructive sleep apnoea syndrome as a risk factor for hypertension: population study. *BMJ*. 2000;320(7233):479-482.
 76. Ryan S, Taylor CT, McNicholas WT. Selective activation of inflammatory pathways by intermittent hypoxia in obstructive sleep apnea syndrome. *Circulation*. 2005;112(17):2660-2667.
 77. Bauters F, Rietzschel ER, Hertegonne KBC, Chirinos JA. The Link Between Obstructive Sleep Apnea and Cardiovascular Disease. *Curr Atheroscler Rep*. 2016;18(1):1-11.
 78. Somers VK, Dyken ME, Clary MP, Abboud FM. Sympathetic neural mechanisms in obstructive sleep apnea. *J Clin Invest*. 1995;96(4):1897-1904.
 79. Barcelo A, Pierola J, Esquinas C, et al. Relationship between aldosterone and the metabolic syndrome in patients with obstructive sleep apnea hypopnea syndrome: Effect of continuous positive airway pressure treatment. *PLoS One*. 2014;9(1):1-7.
 80. Svatikova A, Olson LJ, Wolk R, et al. Obstructive sleep apnea and aldosterone. *Sleep*. 2009;32(12):1589-1592.
 81. Kohler M, Stoewhas A-C, Ayers L, et al. Effects of Continuous Positive Airway Pressure Therapy Withdrawal in Patients with Obstructive Sleep Apnea. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;184(10):1192-1199.
 82. Adegunsoye A, Ramachandran S. Etiopathogenetic mechanisms of pulmonary hypertension in sleep-related breathing disorders. *Pulm Med*. 2012;2012:273591.
 83. Lavie L. Obstructive sleep apnoea syndrome - An oxidative stress disorder. *Sleep Med Rev*. 2003;7(1):35-51.
 84. Lavie L. Oxidative stress in obstructive sleep apnea and intermittent hypoxia - Revisited - The bad ugly and good: Implications to the heart and brain. *Sleep Med Rev*. 2015;20:27-45.
 85. Barcelo A, Barbe F, de la Pena M, et al. Antioxidant status in patients with sleep apnoea and impact of continuous positive airway pressure treatment. *Eur Respir J*. 2006;27(4):756-760.
 86. Levy P, Pepin JL, Arnaud C, Baguet JP, Dematteis M, Mach F. Obstructive sleep apnea and

- atherosclerosis. *Prog Cardiovasc Dis.* 2009;51(5):400-410.
87. Walford GA, Moussignac RL, Scribner AW, Loscalzo J, Leopold JA. Hypoxia Potentiates Nitric Oxide-mediated Apoptosis in Endothelial Cells via Peroxynitrite-induced Activation of Mitochondria-dependent and -independent Pathways. *J Biol Chem.* 2004;279(6):4425-4432.
 88. Esposito K, Nappo F, Marfella R, et al. Inflammatory Cytokine Concentrations Are Acutely Increased by Hyperglycemia in Humans Role of Oxidative Stress. 2002:2067-2073.
 89. Sanner BM, Konermann M, Tepel M, Groetz J, Mummenhoff C, Zidek W. Platelet function in patients with obstructive sleep apnoea syndrome. *Eur Respir J.* 2000;16:648-652.
 90. Dyugovskaya L, Lavie P, Lavie L. Phenotypic and functional characterization of blood gammadelta T cells in sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;168(2):242-249.
 91. Ryan S, Taylor CT, McNicholas WT. Predictors of elevated nuclear factor-kappaB-dependent genes in obstructive sleep apnea syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;174(7):824-830.
 92. Sahlman J, Meittinen K, Peuhkurinen K, et al. The activation of the inflammatory cytokines in overweight patients with mild obstructive sleep apnoea. *J Sleep Res.* 2010;19(2):341-348.
 93. Hoyos CM, Melehan KL, Liu PY, Grunstein RR, Phillips CL. Does obstructive sleep apnea cause endothelial dysfunction? A critical review of the literature. *Sleep Med Rev.* 2014;20:15-26.
 94. Kraiczi H, Caidahl K, Samuelsson A, Peker Y. Impairment of Vascular Endothelial Function and Left Ventricular Filling: Association With the Severity of Apnea-Induced Hypoxemia During Sleep. *Chest.* 2001;119(4):1085-1091.
 95. Kohler M, Craig S, Nicoll D, Leeson P, Davies RJO, Stradling JR. Endothelial Function and Arterial Stiffness in Minimally Symptomatic Obstructive Sleep Apnea. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008;178(9):984-988.
 96. Dewan NA, Nieto FJ, Somers VK. Intermittent hypoxemia and OSA: Implications for comorbidities. *Chest.* 2015;147(1):266-274.
 97. Drager LF, Polotsky V. Lipid Metabolism: A New Frontier in Sleep Apnea Research. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011;184:288-290.
 98. Chirinos JA, Gurubhagavatula I, Teff K, et al. CPAP, Weight Loss, or Both for Obstructive Sleep Apnea. *N Engl J Med.* 2014;370(24):2265-2275.
 99. Phillips CL, Butlin M, Wong KK, Avolio AP. Is obstructive sleep apnoea causally related to arterial stiffness? A critical review of the experimental evidence. *Sleep Med Rev.* 2013;17(1):7-18.

100. Jones A, Vennelle M, Connell M, et al. Arterial stiffness and endothelial function in obstructive sleep apnoea/hypopnoea syndrome. *Sleep Med.* 2013;14(5):428-432.
101. Gottlieb DJ, Yenokyan G, Newman AB, et al. Prospective study of obstructive sleep apnea and incident coronary heart disease and heart failure: The sleep heart health study. *Circulation.* 2010;122(4):352-360.
102. Marshall NS, Wong KKH, Liu PY, Cullen SRJ, Knuiiman MW, Grunstein RR. Sleep apnea as an independent risk factor for all-cause mortality: the Busselton Health Study. *Sleep.* 2008;31(8):1079-1085.
103. Peppard P, Young T, Palta M, Skatrud J. Prospective Study of the Association Between Sleep-Disordered. *N Engl J Med.* 2000;342(19):1378-1384.
104. Marin J, Agusti A, Villar I, et al. Association Between Treated and Untreated Obstructive Sleep Apnea and Risk of Hypertension. *JAMA.* 2012;307(20):2169-2176.
105. Cano-Pumarega I, Duran-Cantolla J, Aizpuru F, et al. Obstructive sleep apnea and systemic hypertension: longitudinal study in the general population: the Vitoria Sleep Cohort. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011;184(11):1299-1304.
106. Gottlieb DJ, Punjabi NM, Mehra R, et al. CPAP versus oxygen in obstructive sleep apnea. *N Engl J Med.* 2014;370(24):2276-2285.
107. Barbe F, Mari JM, Garcia-rio F, Atauri JD De. Long-term Effect of Continuous Positive Airway Pressure in Hypertensive Patients with Sleep Apnea. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010;181:718-726.
108. Sin DD, Fitzgerald F, Parker JD, Newton G, Floras JS, Bradley TD. Risk factors for central and obstructive sleep apnea in 450 men and women with congestive heart failure. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;160(4):1101-1106.
109. Javaheri S, Parker T, Liming J, et al. Sleep Apnea in 81 Ambulatory Male Patients With Stable Heart Failure. *Circulation.* 1998;97:2154-2159.
110. Somers V, White D, Amin R, et al. Sleep apnea and cardiovascular disease: an American Heart Association/American College of Cardiology Foundation Scientific Statement from the American Heart Association Council for High Blood Pressure Research Professional Education Committee, Council on. *J Am Coll Cardiol.* 2008;52(8):686-717.
111. Caples SM, Somers VK. Sleep Disordered Breathing and Atrial Fibrillation. *Prog Cardiovasc Dis.* 2009;51(5):411-415.
112. Johnson KG, Johnson DC. Frequency of sleep apnea in stroke and TIA patients: A meta-

- analysis. *J Clin Sleep Med*. 2010;6(2):131-137.
113. Bassetti CL, Milanova M, Gugger M. Sleep-disordered breathing and acute ischemic stroke: Diagnosis, risk factors, treatment, evolution, and long-term clinical outcome. *Stroke*. 2006;37(4):967-972.
 114. Malhotra A, White DP. Obstructive sleep apnoea. *Lancet*. 2002;360(9328):237-245.
 115. Khayat R, Jarjoura D, Porter K. Sleep disordered breathing and post-discharge mortality in patients with acute heart failure. *Eur Hear J*. 2015;36:1463-1469.
 116. Shamsuzaaman ASM, Gersh BJ, Somers VK. Obstructive Sleep Apnea - Implications for Cardiac and Vascular Disease. *JAMA*. 2003;290(14):1906-1914.
 117. Drager LF, Togeiro SM, Polotsky V, Lorenzi-Filho G. Obstructive Sleep Apnea. A Cardiometabolic Risk in Obesity and the Metabolic Syndrome. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62(7):569-576.
 118. Campos-Rodriguez F, Martínez-García MA, de la Cruz-Moron I, Almeida-Gonzalez C. Cardiovascular mortality in women with obstructive sleep apnea with or without continuous airway pressure treatment: a cohort study. *Ann Intern Med*. 2012;156:115-122.
 119. Marin JM, Carrizo SJ, Vicente E, Agusti AGN. Long-term cardiovascular outcomes in men with obstructive sleep apnoea-hypopnoea with or without treatment with continuous positive airway pressure: An observational study. *Lancet*. 2005;365(9464):1046-1053.
 120. Javaheri S, Caref EB, Chen E. Sleep apnea testing and outcomes in a large cohort of Medicare beneficiaries with newly diagnosed heart failure. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;183:539-546.
 121. Pagidipati NJ, Peterson ED. Acute coronary syndromes in women and men. *Nat Rev Cardiol*. 2016;13(8):471-480.
 122. Anderson JL, Morrow DA. Acute Myocardial Infarction. *N Engl J Med*. 2017;376(21):2053-2064.
 123. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, et al. Third Universal Definition of Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2012;60(16):1581-1598.
 124. Pagidipati NJ, Peterson ED. Acute coronary syndromes in women and men. *Nat Rev Cardiol*. 2016;13(8):471-480.
 125. Berry JD, Dyer A, Cai X, et al. Lifetime Risks of Cardiovascular Disease. *N Engl J Med*. 2012;366(4):321-329.
 126. Jaffe AS, Babuin L, Apple FS. Biomarkers in Acute Cardiac Disease. The Present and the Future. *J Am Coll Cardiol*. 2006;48(1):1-11.

127. White HD. Pathobiology of troponin elevations: do elevations occur with myocardial ischemia as well as necrosis? *J Am Coll Cardiol.* 2011;57(24):2406-2408.
128. Amsterdam EA, Wenger NK, Brindis RG, et al. *AHA/ACC Guideline for the Management of Patients with Non-ST-Elevation Acute Coronary Syndromes: Executive Summary: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines.* Vol 130.; 2014.
129. Roffi M, Patrono C, Collet J-PP, et al. ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. *Eur Heart J.* 2015;Guidelines:1-59.
130. Canto JG, Goldberg RJ, Hand MM, et al. Symptom Presentation of Women With Acute Coronary Syndromes. *Arch Intern Med.* 2007;167(22):2405-2413.
131. Solecki K, Dupuy AM, Kuster N, Leclercq F, Gervasoni R, Macia JC. Kinetics of high-sensitivity cardiac troponin T or troponin I compared to creatine kinase in patients with revascularized acute myocardial infarction. *Clin Chem Lab Med.* 2015;53(5):707-714.
132. Fanekova J, Blaha M, Belohoubek J, Kotrbata M, Secnik P. A clinical and laboratory approach used to elucidate discordant results of high-sensitivity troponin T and troponin I. *Clin Chim Acta.* 2015;446:128-131.
133. Levine GN, Bates ER, Blankenship JC, et al. 2015 ACC/AHA/SCAI Focused Update on Primary Percutaneous Coronary Intervention for Patients with ST-Elevation Myocardial Infarction An Update of the 2011 ACCF/AHA/SCAI Guideline for Percutaneous Coronary Intervention and the 2013 ACCF/AHA Guideline for th. *J Am Coll Cardiol.* 2016;67(10):1235-1250.
134. Salomaa V, Dobston A, Miettinen H. Mild myocardial infarction-a classification problem i epidemiologic studies. *J Clin Epidemiol.* 1997;50:3-13.
135. Hamm CW, Bassand J-P, Agewall S, et al. ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute coronary syndromes (ACS) in patients presenting without persistent ST-segment elevatio. *Eur Heart J.* 2011;32(23):2999-3054.
136. Hellermann JP, Reeder GS, Jacobsen SJ, Weston SA, Killian JM, Roger VL. Longitudinal trends in the severity of acute myocardial infarction: A population study in Olmsted County, Minnesota. *Am J Epidemiol.* 2002;156(3):246-253. doi:10.1093/aje/kwf034.
137. Killip T, Kimball JT. Treatment of myocardial infarction in a coronary unit. A two year experience with 250 patients. *Am J Cardiol.* 1967;20(4):457-464.

138. Bahit M, Kochar A, Granger C b. Post-Myocardial Infarction Heart Failure . *JACC Hear Fail*. 2018;6(3):179-186.
139. Sulo G, Nygard O, Vollset s e, Igland J, Ebbing M, Sulo E. Higher education is associated with reduced risk of heart failure among patients with acute myocardial infarction : A nationwide analysis using data from the CVDNOR project . *Eur J Prev Cardiol*. 2016;23(16):1743-1750.
140. Somers VK, White DP, Amin R, et al. Sleep Apnea and Cardiovascular Disease. An American Heart Association/American College of Cardiology Foundation Scientific Statement From the American Heart Association Council for High Blood Pressure Research Professional Education Committee, Council on. *J Am Coll Cardiol*. 2008;52(8):686-717.
141. Olafiranye O, Reis S. Sleep apnea and subclinical myocardial injury: where do we stand? *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;188:1394-1395.
142. Stansbury RC, Strollo PJ. Clinical manifestations of sleep apnea. *J Thorac Dis*. 2015;7(9):E298-310.
143. Konecny T, Sert Kuniyoshi FH, Orban M, et al. Under-diagnosis of sleep apnea in patients after acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2010;56(9):742-743.
144. Ludka O, Stepanova R, Vyskocilova M, Galkova L, Mikolaskova M, Belehrad M. Sleep apnea prevalence in acute myocardial infarction - The Sleep Apnea in Post-acute Myocardial Infarction Patients (SAPAMI) Study. *Int J Cardiol*. 2014;176:13-19.
145. Mediano O, Masdeu MJ, McEvoy D, Barbé F. Sleep apneas and cardiovascular risk after Sleep Apnea Cardiovascular Endpoints Study. What next? *Arch Bronconeumol*. 2017;(xx):5-6.
146. Esquinas C, Sanchez-de-la-Torre M, Aldoma A, et al. Rationale and methodology of the impact of continuous positive airway pressure on patients with ACS and nonsleepy OSA : the ISAACC trial. *Clin Cardiol*. 2013;36(9):495-501.
147. Spanish National Consensus. Sleep apnea-hypopnea syndrome (SAHS) [article in Spanish]. *Arch Bronconeumol*. 2015;41(Suppl 4):7-9. doi:10.1007/s11325-015-1143-9.
148. Biomarkers Definition Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther*. 2001;69:89-95.
149. WHO International Programme on Chemical Safety. Biomarkers in Risk Assessment: Validity and Validation. 2001.
150. Strimbu K, Tavel JA. What are biomarkers? *Curr Opin HIV AIDS*. 2010;5(6):463-466.
151. Mayeux R. Biomarkers: potential uses and limitations. *J Am Soc Exp NeuroTher*. 2004;1:182-

- 188.
152. Naylor S. Biomarkers: current perspectives and future prospects. *Expert Rev Mol Diagn.* 2003;3:525-529.
153. de Lemos JA, Morrow DA. Brain Natriuretic Peptide Measurement in Acute Coronary Syndromes. *Circulation.* 2002;106:2868-2870.
154. Bauça, JM; Martinez-Morillo, E; Diamandis E. Peptidomics of urine and other biofluids for cancer diagnostics. *Clin Chem.* 2014;60(8):1052-1061.
155. Morrow DA, De Lemos JA. Benchmarks for the assessment of novel cardiovascular biomarkers. *Circulation.* 2007;115(8):949-952.
156. May A, Wang T.J. Biomarkers for cardiovascular disease : challenges and future directions. *Trends Mol Med.* 2008;14(6):261-267.
157. Ridker PM, Buring JE, Rifai N, Cook NR. Development and validation of improved algorithms for the assessment of global cardiovascular risk in women : the Reynolds. *JAMA.* 2007;297(6):611-619.
158. Ferri N, Paoletti R, Corsini A. Lipid-modified proteins as biomarkers for cardiovascular disease : a. *Biomarkers.* 2005;10(4):219-237.
159. Mozaffarian D. Free fatty acids, cardiovascular mortality and cardiometabolic stress. *Eur Hear J.* 2007;28:2699-2700.
160. Miedema M, Maziarz M, Biggs M, et al. Plasma Free Fatty Acids, Fatty Acid-binding Protein 4, and Mortality in Older Adults (From the Cardiovascular Health Study). *Am J Cardiol.* 2014;114(6):843-848.
161. Azzazy HME, Pelsers MMAL, Christenson RH. Unbound free fatty acids and heart-type fatty acid-binding protein: Diagnostic assays and clinical applications. *Clin Chem.* 2006;52(1):19-29.
162. Lévy P, Bonsignore MR, Eckel J. Sleep, sleep-disordered breathing and metabolic consequences. *Eur Respir J.* 2009;34(1):243-260.
163. Drager LF, Lopes HF, Maki-Nunes C, Trombetta IC, Toschi-Dias E, Alves MJ. The impact of obstructive sleep apnea on metabolic and inflammatory markers in consecutive patients with metabolic syndrome. *PLoS One.* 2010;5(8):e12065.
164. Elmasry A, Janson C, Lindberg E. The role of habitual snoring and obesity in the development of diabetes: a 10-year follow-up study in a male population. *J Intern Med.* 2000;248:13.20.
165. Shaw JE, Punjabi NM, P WJ. Sleep-disordered breathing and type 2 diabetes: a report from the

- International Diabetes Federation Taskforce on Epidemiology and Prevention. *Diabetes Res Clin Pr.* 2008;81:2-12.
166. Reichmuth KJ, Austin D, Skatrud JB. Association of sleep apnea and type II diabetes: a population-based study. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;172:1590-1595.
167. Barceló A, Barbé F, de la Peña M, Martínez P, Soriano JB. Insulin resistance and daytime sleepiness in patients with sleep apnoea. *Thorax.* 2008;63(11):946-950.
168. Strand LB, Carnethon M, Biggs M Lou, et al. Sleep Disturbances and Glucose Metabolism in Older Adults: The Cardiovascular Health Study. *Diabetes Care.* 2015;38(11):2050-2058. <http://care.diabetesjournals.org/lookup/doi/10.2337/dc15-0137>.
169. Balsarak I, Jackson N, Ratcliffe SA, Pack AI, Pien GW. Sleep-disordered breathing and daytime napping are associated with maternal hyperglycemia. *Sleep Breath.* 2013;17(3):1093-1102.
170. Stoohs RA, Facchini F, Guilleminault C. Insulin resistance and sleep-disordered breathing in healthy humans. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996;154:170-174.
171. De Luca Canto G, Pacheco-Pereira C, Aydinov S, Major PW, Flores-Mir C, Gozal D. Biomarkers associated with obstructive sleep apnea: A scoping review. *Sleep Med Rev.* 2015;23:28-45.
172. Li AM, Chan MH, Df, Chan DF, et al. Insulin and obstructive sleep apnea in obese Chinese children . *Pediatr Pulmonol.* 2006;41(12):1175-1181.
173. Lavie L. Oxidative stress and inflammation in OSA. *Eur Resp Monogr.* 2010;50:360-380.
174. Schulz R, Mahmoudi S, Hattar K, Sibelius U, Olschewski H, Mayer K. Enhanced release of superoxide from polymorphonuclear neutrophils in obstructive sleep apnea. Impact of continuous airway pressure therapy. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;162:566-570.
175. Wang Y, Yang J, Yi J. Redox sensing by proteins: oxidative modifications on cysteines and the consequent events. *Antioxid Redox Signal.* 2012;16:649-657.
176. Carpagnano GE, Kharitonov SA, Resta O, Foschino-Barbaro MP, Gramiccioni E. 8-isoprostane, a marker of oxidative stress, is increased in exhaled breath condensate of patients with obstructive sleep apnea after night and is reduced by continuous airway pressure therapy. *Chest.* 2003;124:1386-1392.
177. Lavie L, Vishnevsky A, Lavie P. Evidence for lipid peroxidation in obstructive sleep apnea. *Sleep.* 2004;27:123-128.
178. Holdenrieder S, Stieber P, Bodenmüller H, et al. Nucleosomes in serum as a marker for cell death. *Clin Chem Lab Med.* 2001;39(7):596-605.

179. Cui M, Fan M, Jing R, et al. Cell-free circulating DNA: A new biomarker for the acute coronary syndrome. *Cardiol.* 2013;124(2):76-84.
180. Jing RR, Wang HM, Cui M, et al. A sensitive method to quantify human cell-free circulating DNA in blood: relevance to myocardial infarction screening. *Clin Biochem.* 2011;44(13):1074-1079.
181. Van Montfoort ML, Stephan F, Lauw MN, et al. Circulating nucleosomes and neutrophil activation as risk factors for deep vein thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013;33(1):147-151.
182. Holdenrieder S, Nagel D, Schalhorn A, et al. Clinical relevance of circulating nucleosomes in cancer. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1137:180-189.
183. Shin C, Kim JK, Kim JH, Jung KH, Cho KJ, Lee CK. Increased cell-free DNA concentrations in patients with obstructive sleep apnea. *Psychiatry andf Clin Neurosci.* 2008;62:721-727.
184. Beaudoux J, Giral P, John M. Matrix metalloproteinases , inflammation and atherosclerosis : therapeutic perspectives. *Clin Chem Lab Med.* 2004;42(2):121-131.
185. Samnegard A, Hulthe J, Silveira A, Ericsson CG, Hamsten A, Eriksson P. Gender specific associations between matrix metalloproteinases and inflammatory markers in post myocardial infarction patients. *Atherosclerosis.* 2009;202(2):550-556.
186. Hansson J, Vasan RS, Ärnlöv J, et al. Biomarkers of extracellular matrix metabolism (MMP-9 and TIMP-1) and risk of stroke, myocardial infarction, and cause-specific mortality: Cohort study. *PLoS One.* 2011;6(1).
187. Chuang LP, Chen NH, Lin SW, Chang YL, Chao IJ, Pang JHS. Increased matrix metalloproteinases-9 after sleep in plasma and in monocytes of obstructive sleep apnea patients. *Life Sci.* 2013;93(5-6):220-225.
188. Garvin P, Nilsson L, Carstensen J, Jonasson L, Kristenson M. Circulating Matrix Metalloproteinase-9 Is Associated with Cardiovascular Risk Factors in a Middle-Aged Normal Population. *PLoS One.* 2008;3(3):e1774.
189. Blankenberg S, Rupprecht HJ, Poirier O, et al. Clinical Investigation and Reports Plasma Concentrations and Genetic Variation of Matrix Metalloproteinase 9 and Prognosis of Patients With Cardiovascular Disease. *Circulation.* 2003;107:1579-1585.
190. Brenner DR, Scherer D, Muir K, et al. A review of the application of inflammatory biomarkers in epidemiologic cancer research. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2014;23(9):1729-1751.
191. Zakynthinos E, Pappa N. Inflammatory biomarkers in coronary artery disease. *J Cardiol.* 2009;53(3):317-333.

192. Weinberg EO, Shimpo M, De Keulenaer GW, et al. Expression and regulation of ST2, an interleukin-1 receptor family member, in cardiomyocytes and myocardial infarction. *Circulation*. 2002;106(23):2961-2966.
193. Eggers KM, Lindahl B. Prognostic Biomarkers in Acute Coronary Syndromes : Risk Stratification Beyond Cardiac Troponins. *Curr Cardiol Rep*. 2017;19(29).
194. Guilleminault C, Kirisoglu C, Ohayon MM. C-Reactive Protein and Sleep-Disordered Breathing. *Sleep*. 2004;27(8):1507-1517.
195. Bonanno A, Rosaria M. Relaxin in Obstructive Sleep Apnea : Relationship with Blood Pressure and. *Respiration*. 2016;91:56–62:56-62.
196. Bouloukaki I, Mermigkis C, Kallergis e m, Moniaki V, Mauroudi E, Schiza SE. Obstructive sleep apnea syndrome and cardiovascular disease : The influence of C-reactive protein . *World J Exp Med*. 2015;20(5):77-83.
197. Nadeem R, Molnar J, Madbouly EM, et al. Serum inflammatory markers in obstructive sleep apnea: A meta-analysis. *J Clin Sleep Med*. 2013;9(10):1003-1012.
198. Kinnunen P, Vuolteenaho O, Ruskoaho H. Mechanisms of atrial and brain natriuretic peptide release from rat ventricular myocardium: effect of stretching. *Endocrinology*. 1993;132(5):1961-1970.
199. Yasue H, Yoshimura M, Sumida H. Localization and mechanism of secretion of B-type natriuretic peptide in comparison with those of A-type natriuretic peptide in normal subjects and patients with heart failure, *Circulation* 195, . *Circulation*. 1994;90:195-203.
200. Bay M, Kirk V, Parner J, et al. NT-proBNP: a new diagnostic screening tool to differentiate between patients with normal and reduced left ventricular systolic function. *Heart*. 2003;89(2):150-154.
201. Bhalla V, Willis S, Maisel AS. B-Type Natriuretic Peptide: The Level and the Drug?Partners in the Diagnosis and Management of Congestive Heart Failure. *Congest Hear Fail*. 2004;10(s1):3-27.
202. Maisel A, Hollander JE, Guss D, et al. Primary results of the Rapid Emergency Department Heart Failure Outpatient Trial (REDHOT): A multicenter study of B-type natriuretic peptide levels, emergency department decision making, and outcomes in patients presenting with shortness of breath. *J Am Coll Cardiol*. 2004;44(6):1328-1333.
203. James SK, Lindahl B, Siegbahn A, et al. N-terminal pro-brain natriuretic peptide and other risk markers for the separate prediction of mortality and subsequent myocardial infarction in patients

- with unstable coronary artery disease: A global utilization of strategies to open occluded arteries. *Circulation*. 2003;108(3):275-281.
204. Choi SG, Jeong MH, Ahn Y, Cho JG, Kang JC, Chae SC. Relationship between obesity and N-terminal brain natriuretic peptide level as a prognostic value after acute myocardial infarction. *Korean Circ J*. 2010;40(11):558-564.
205. Morgenthaler NG. Copeptin: A biomarker of cardiovascular and renal function. *Congest Hear Fail*. 2010;16(Suppl. 1):37-44.
206. Voors AA, Von Haehling S, Anker SD, et al. C-terminal pro vasopressin (copeptin) is a strong prognostic marker in patients with heart failure after an acute myocardial infarction: Results from the OPTIMAAL study. *Eur Heart J*. 2009;30(10):1187-1194.
207. Khurana R, Simons M, Martin JF, Zachary IC. Role of angiogenesis in cardiovascular disease: A critical appraisal. *Circulation*. 2005;112(12):1813-1824.
208. Hochholzer W, Reichlin T, Stelzig C, et al. Impact of soluble fms-like tyrosine kinase-1 and placental growth factor serum levels for risk stratification and early diagnosis in patients with suspected acute myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2011;32(3):326-335.
209. Khurana R, Moons L, Shafi S, et al. Placental growth factor promotes atherosclerotic intimal thickening and macrophage accumulation. *Circulation*. 2005;111(21):2828-2836.
210. De Falco S, Gigante B, Persico MG. Structure and function of placental growth factor. *Trends Cardiovasc Med*. 2002;12(6):241-246.
211. Carnevale D, Lembo G. Placental Growth Factor and Cardiac Inflammation. *Trends Cardiovasc Med*. 2012;22(8):209-212.
212. Accornero F, Van Berlo JH, Benard MJ, Lorenz JN, Carmeliet P, Molkentin JD. Placental growth factor regulates cardiac adaptation and hypertrophy through a paracrine mechanism. *Circ Res*. 2011;109(3):272-280.
213. Matsui M, Takeda Y, Uemura S, Matsumoto T, Seno A. Suppressed soluble Fms-like tyrosine kinase-1 production aggravates atherosclerosis in chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2014;85:393-403.
214. Cassidy A, Chiuve SE, Manson JE, Roxrode KM, Girman CJ. Potential role for placental growth factor in predicting coronary heart disease risk in women. *Atheroscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29:134-139.
215. Gozal D, Lipton AJ, Jones KL. Circulating vascular endothelial growth factor levels in patients with obstructive sleep apnea. *Sleep*. 2002;25(1):59-65.

216. Iwama H, Uemura S, Naya N, et al. Cardiac Expression of Placental Growth Factor Predicts the Improvement of Chronic Phase Left Ventricular Function in Patients With Acute Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2006;47(8):1559-1567.